



**WILLIAN LUIS ANTONIO ZANCAN**

**SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E EFEITOS  
DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES DE  
FEIJOEIRO**

**LAVRAS – MG**

**2011**

**WILLIAN LUIS ANTONIO ZANCAN**

**SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E EFEITOS DE *Sclerotinia*  
*sclerotiorum* EM SEMENTES DE FEJJOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

**Orientador**

**Prof. Ph.D. José da Cruz Machado**

**LAVRAS – MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Zancan, Willian Luis Antonio.

Sensibilidade a fungicidas e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum*  
em sementes de feijoeiro / Willian Luis Antonio Zancan. – Lavras :  
UFLA, 2011.

86 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. Mofo branco. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. Restrição hídrica. 4.  
Escleródios. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

**WILLIAN LUIS ANTONIO ZANCAN**

**SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E EFEITOS DE *Sclerotinia*  
*sclerotiorum* EM SEMENTES DE FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de setembro de 2011.

Ph.D. Luiz Gonzaga Chitarra    Embrapa Algodão

Dr. Mario Sobral de Abreu    UFLA

Prof. Ph.D. José da Cruz Machado  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2011**

Aos meus pais, Luiz Antonio Zancan e Neuza Peretto Zancan, pela educação, paciência, confiança e ajuda nesta caminhada de fundamental importância em minha vida, incentivando-me a buscar vida nova durante estes anos...

A minha irmã, Maria Cristina Zancan, pelo carinho.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela oportunidade e o privilégio de compartilhar tamanha experiência e que comigo esteve a cada dia, concedendo-me saúde, força e determinação.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade e suporte para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. José da Cruz Machado, pelo incentivo, ensinamentos, amizade, presteza e auxílio nas atividades e discussões, em todas as fases deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Gonzaga Chitarra e à Dra. Gilma Silva Chitarra, pela amizade e incentivo em buscar novas oportunidades.

A Dra. Luana da Silva Botelho e Dra. Ellen Noly Barrocas, pelo auxílio na condução dos trabalhos.

A toda a equipe do Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS) da UFLA que esteve ao meu lado, proporcionando auxílio e aprendizado, durante a elaboração deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da UFLA, pelos conhecimentos transmitidos, em especial ao Dr. Mario Sobral de Abreu, pela amizade, dedicação e ensinamentos.

## RESUMO GERAL

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um importante patógeno causador de doenças em várias espécies vegetais economicamente importantes em todo o mundo. O manejo das doenças causadas por este patógeno tem sido dificultado pela formação de estruturas de resistência, os escleródios, os quais podem permanecer viáveis no solo por vários anos. A infecção das plantas pode ocorrer através do micélio e/ou ascósporos produzidos pela germinação dos escleródios, ou a partir de micélio associado às sementes. Estes tipos de inóculo são responsáveis pela disseminação da doença a curtas e a longas distâncias, em aéreas isentas do referido fungo. Entre as medidas de manejo da doença, o controle químico se destaca pela sua eficácia e o conhecimento de sua aplicação é um alvo permanente da pesquisa. Neste trabalho, os objetivos foram avaliar a sensibilidade de *S. sclerotiorum* a alguns fungicidas disponíveis no mercado e dimensionar os efeitos deste patógeno a partir de sua interação com sementes de feijão. No bioensaio conduzido em laboratório, verificou-se que todos os fungicidas químicos testados, tiofanato metílico, procimidone, fluazinam, piraclostrobina, fluquinconazole e *Trichoderma harzianum*, foram eficazes em reduzir ou impedir o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* em níveis variados, sendo mais destacados os produtos procimidone e fluazinam. A formação de escleródios em colônias desenvolvidas na presença dos fungicidas foi reduzida, mas não eliminada. Em relação aos efeitos do patógeno nas sementes infectadas, houve uma redução dos valores médios de todas as variáveis consideradas neste ensaio: germinação, sanidade, índice de velocidade de emergência, estande inicial e final, e peso de matéria seca da parte aérea e raiz das plantas de feijão, em níveis proporcionais ao aumento do potencial do inóculo presente nas sementes. Nos potenciais de inóculo mais elevados, que correspondem a uma maior pressão de inóculo infectivo, ambas as cultivares e ambos os isolados de *S. sclerotiorum* apresentaram desempenhos semelhantes, com danos progressivos ao desenvolvimento das plantas oriundas de sementes infectadas pelo patógeno.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*. Controle. Sementes.

## GENERAL ABSTRACT

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is an important pathogen causing diseases in many economically important plant species worldwide. The management of diseases caused by this pathogen has been hampered by the formation of resistance structures, the sclerotia, which can remain viable in soil for several years. The infection of plants can occur through the mycelium and/or ascospores produced by the germination of sclerotia or as mycelium associated with seeds. These types of inoculum are responsible for spreading the disease to short and long distances in air free of this fungus. Among the management measures of disease control chemist noted for its effectiveness and knowledge of its application is a perennial target of the research. In this study the objectives were to evaluate the sensitivity of *S. sclerotiorum* some fungicides on the market size and the effects of this pathogen from its interaction with bean seeds. In the bioassay conducted in the laboratory, it was found that all tested fungicides, thiophanate methyl, procymidone, fluazinam, pyraclostrobin, and *Trichoderma harzianum* fluquinconazol were effective in reducing or preventing the development of *S. sclerotiorum* to varying degrees, being the most outstanding products and procymidone fluazinam. The formation of sclerotia in cultures grown in the presence of fungicides was reduced but not eliminated. Regarding the effects of the pathogen in infected seeds, there was a reduction of the average values of all variables considered in this essay: germination, health, emergency speed index, initial and final stands, and dry weight of shoots and roots of dry bean plants at levels commensurate with the increased potential of inoculum present in the seeds. In the higher inoculum potential, corresponding to a higher infective inoculum pressure, both cultivars and both isolates of *S. sclerotiorum* showed similar performance, with progressive damage to the development of plants from seeds infected by the pathogen.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*. Control. Seeds.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1.....</b>	12
	Introdução geral.....	12
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	15
<b>2.1</b>	<b>Cultivo do feijoeiro no Brasil.....</b>	15
<b>2.2</b>	<b>O mofo branco no cultivo do feijoeiro.....</b>	16
<b>2.3</b>	<b>Sintomatologia da doença.....</b>	18
<b>2.4</b>	<b>Ciclo da doença e epidemiologia.....</b>	19
<b>2.5</b>	<b>Métodos de controle do mofo branco.....</b>	21
<b>2.5.1</b>	<b>Controle Químico.....</b>	21
<b>2.5.2</b>	<b>Controle Biológico.....</b>	23
<b>2.6</b>	<b>Veiculação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em sementes de feijoeiro.....</b>	26
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	28
	<b>CAPÍTULO 2.....</b>	35
	Avaliação da sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> a fungicidas.....	35
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	37
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	40
<b>2.1</b>	<b>Obtenção e multiplicação do inóculo de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....</b>	40
<b>2.2</b>	<b>Avaliação de fungicidas no crescimento micelial, produção e germinação de escleródios.....</b>	41
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	43
<b>3.1</b>	<b>Efeitos de fungicidas no crescimento micelial, produção e germinação de escleródios.....</b>	43
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	43
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	54
	<b>CAPÍTULO 3.....</b>	57
	Relação entre potencial de inóculo de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e desempenho de sementes de feijão infectadas.....	57
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	59
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	61
<b>2.1</b>	<b>Obtenção e multiplicação dos isolados fúngicos.....</b>	61
<b>2.2</b>	<b>Perfil dos lotes de sementes utilizados.....</b>	61
<b>2.3</b>	<b>Preparo e inoculação das sementes.....</b>	62
<b>2.4</b>	<b>Avaliação da qualidade de sementes de feijão infectadas por <i>S. sclerotiorum</i> em diferentes níveis de potencial de</b>	<b>63</b>

	<b>inóculo.....</b>	
<b>2.5</b>	<b>Análise dos dados.....</b>	<b>66</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>83</b>
	<b>ANEXO B.....</b>	<b>84</b>

## **CAPÍTULO 1**

### **Introdução geral**

#### **1 INTRODUÇÃO**

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), espécie originária da América do Sul, México e Guatemala, é um dos principais alimentos da população brasileira, especialmente a de baixa renda.

Com base nas estatísticas da FAO (2005), o feijão é cultivado em 117 países em todo o mundo, com produção em torno de 19 milhões de toneladas, em 26,8 milhões de hectares de área. Em 2005, aproximadamente 66,2% da produção originou-se de apenas sete países, sendo o Brasil o maior produtor mundial, responsável por 16,2 % da produção (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2006). Na maioria das regiões produtoras predomina a exploração do feijoeiro por pequenos produtores, com uso reduzido de insumos, obtendo-se, dessa forma, baixas produções.

O feijão tem grande importância sócio-econômica em todas as regiões brasileiras, por ser um alimento de consumo básico para a população. Assim, as áreas de cultivo dessa leguminosa vêm aumentando no país e, paralelamente, a ocorrência de muitas doenças, em razão do uso de grãos em substituição às sementes, por parte dos produtores (AGRIANUAL, 2009; PEREIRA & YOKOYAMA, 1999).

A qualidade sanitária de sementes utilizadas nos campos de produção é uma das questões fitossanitárias mais debatidas no Brasil, há vários anos (ARAÚJO, 1998).

Dentre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos do feijoeiro estão as doenças, com um total de 20 já identificadas no Brasil, causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus (DI STEFANO, 2003; EMBRAPA, 2006). A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e entre regiões, dependendo das condições climáticas de cada safra.

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Bary é causador de diversas doenças em diferentes culturas, entre as quais destacam-se feijão, soja, algodão e girassol, que são de grande importância econômica. O patógeno tem como hospedeiros aproximadamente 408 espécies de plantas, incluindo algumas de maior interesse econômico, a exemplo das espécies já mencionadas (BOLLAND; HALL, 1994).

A doença inicia-se em reboleiras, na lavoura e as plantas que têm seu sistema radicular atacado por *S. sclerotiorum* exibem sintomas reflexos na parte aérea, ou seja, nas folhas, hastes e vagens. Os sintomas mais característicos da doença são necrose na haste (sintoma primário) e murcha, seguida da seca das folhas (sintoma reflexo), enquanto os sinais são crescimento de micélio branco cotonoso (mofo) nos tecidos lesionados e a presença de inúmeros escleródios negros de tamanho variável. Os tecidos doentes tornam-se secos, leves e quebradiços, e as sementes infectadas ficam sem brilho, enrugadas e leves (OLIVEIRA, 2005).

De acordo com Meyer & Campos (2009), nas últimas safras, o uso de sementes infectadas ou infestadas pelo patógeno, a monocultura, a utilização de plantas hospedeiras em sucessão ou rotação de culturas e a falta de alternativas de espécies não hospedeiras e economicamente rentáveis para utilização em rotação acarretaram no aumento de inóculo do patógeno em muitas lavouras, proporcionando perdas significativas na cultura do feijoeiro.

O controle de *S. sclerotiorum* em diversas culturas tem sido difícil devido à sua capacidade de formar estruturas de resistência (escleródios), que

lhes garantem sobrevivência por vários anos, mesmo em condições adversas, limitando a utilização de práticas como rotação de culturas. Preferencialmente, a rotação e a sucessão de culturas devem ser feitas com gramíneas e a formação de palhada para cobertura do solo (FERRAZ et al., 2003).

Uma importante medida de controle reside no uso de sementes de boa qualidade sanitária, livres da presença de escleródios e de micélio nos seus tecidos ou tratadas com fungicidas recomendados. Sementes isentas do patógeno e tratadas com fungicidas representam a garantia de se evitar a introdução do patógeno em áreas livres ou a reintrodução de isolados mais agressivos em áreas tradicionais (MEYER; CAMPOS, 2009).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Cultivo do feijoeiro no Brasil

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) vem se destacando no cenário nacional pelo cultivo em praticamente todos os estados brasileiros. Na safra 2009/10, a cultura do feijão ocupou, aproximadamente, 3,608 milhões de hectares de área de plantio no país, sendo 143 mil hectares na região norte, com produção de 81,9 mil toneladas. As regiões nordeste e centro-oeste foram responsáveis pelo plantio de 1.843,6 e 257,7 mil hectares, com produção de 698,1 e 493,2 mil toneladas, respectivamente. Nas regiões sudeste e sul, as áreas totais plantadas com feijoeiro foram de 626,5 e 738 mil hectares e a produção de 972,1 e 1.077,2 mil toneladas, respectivamente. Estes dados indicam a grande oscilação da produtividade entre regiões, em decorrência das condições edafoclimáticas, da época de plantio e da tecnologia empregada para o manejo da cultura, havendo variações de 380 kg/ha<sup>-1</sup> (região nordeste) a 1.914 kg/ha<sup>-1</sup> (região centro-oeste). Em algumas regiões, como, por exemplo, no centro-oeste, especificamente no estado de Goiás, a produtividade chega próximo de 2.600 kg/ha<sup>-1</sup> (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011).

O plantio do feijoeiro pode ser conduzido em três épocas distintas no ano, sendo, o cultivo de primavera-verão, mais conhecida como feijão das “águas”, com plantio concentrado nos meses de outubro e novembro; o cultivo de verão-outono, ou seja, a safra da seca, com plantio de fevereiro a março e o cultivo de outono-inverno, a safra do inverno, com a semeadura no outono, correspondente aos meses de abril a junho. As safras das águas e da seca são cultivadas de forma tradicional, principalmente por pequenos e médios agricultores com baixo nível tecnológico. No entanto, a safra de inverno é

praticada, na maioria dos casos, por produtores empresariais, utilizando alta tecnologia (ARAÚJO, 1998). Na região centro-oeste, o cultivo do feijoeiro na safra de inverno vem se destacando principalmente em áreas irrigadas por pivô central, onde tem condições favoráveis para o desenvolvimento da cultura, associado a altas produtividades e, conseqüentemente, obtendo bons preços no mercado.

De acordo com a variedade cultivada e as condições edafoclimáticas, o ciclo do feijoeiro pode variar entre 65 e 100 dias. Esse ciclo variável torna a cultura apropriada para compor desde sistemas agrícolas altamente tecnificados, a exemplo de áreas irrigadas, até aqueles com baixo uso tecnológico, principalmente de subsistência. As variações observadas na preferência dos consumidores orientam a pesquisa tecnológica e direcionam a produção e a comercialização do produto. Isso se deve ao fato de as regiões brasileiras serem bem definidas quanto à preferência do grão de feijão comum consumido (BRAGANTINI, 1996).

Inúmeros fatores são limitantes para a produção do feijoeiro comum (SARTORATO et al., 2000), destacando-se às doenças que, além de diminuir a produtividade da cultura, depreciam a qualidade do produto (CARDOSO, 1990). O mofo-branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma das principais doenças da cultura, acarretando danos severos aos plantios de inverno em áreas irrigadas (PARISI; PATRÍCIO; OLIVEIRA, 2006), conseqüentemente causando grandes perdas econômicas.

## **2.2 O mofo-branco no cultivo do feijoeiro**

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal do mofo-branco do feijoeiro, é um fungo que causa doença em muitas espécies vegetais

economicamente importantes em grandes culturas na América do Norte (BOLAND ; HALL, 1994) e na América do Sul. Segundo Delgado et al. (2007), trata-se de um fungo causador de diversas doenças em diferentes espécies vegetais, provocando danos como podridão-mole, mofo-branco, tombamento de pré-emergente e pós-emergente de plantas. Estima-se que aproximadamente 408 espécies vegetais sejam suscetíveis a este patógeno, a exemplo de soja, feijão, algodão e girrasol, todas de grande importância econômica (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; LEITE, 2005; PAULA JÚNIOR et al., 2008).

O primeiro registro da doença no Brasil foi em 1921, no estado de São Paulo, na cultura da batata, sendo detectada em seguida, no ano de 1954, no estado do Rio Grande do Sul, infectando a cultura do feijoeiro. Nos anos de 1976 e 1977 foi detectada no estado do Paraná, na cultura da soja e, depois, relatada, nos anos de 1983 e 1985, na região do cerrado de Minas Gerais e no Distrito Federal (EMBRAPA, 2004).

O fungo, pertencente à classe *Ascomycetes*, ordem Helotiales, produz estruturas de resistência negras, duras, relativamente grandes (até cerca de 1 cm de diâmetro ou comprimento, ou mesmo maiores) e de formato irregular, denominadas de escleródios (PAULA JÚNIOR et al., 2004). Cerca de 90% do ciclo de vida do fungo ocorre no solo, na forma de escleródios (ADAMS; AYERS, 1979).

Os ascósporos são considerados os mais importantes meios de propagação, podendo os escleródios ser disseminados por meio de solo contaminado (em equipamentos agrícolas, calçados, mudas infectadas), adubação com esterco de animais alimentados com restos de plantas infectadas, irrigação e sementes contaminadas (junto a sementes e através de micélio dormente), entre outros (MEYER; CAMPOS, 2009).

As perdas anuais causadas por *S. sclerotiorum* no Brasil chegam a 50% na cultura do feijoeiro, podendo atingir níveis superiores (CARNEIRO, 2009), conforme relata Ferdinando (1980).

Na cultura da soja, as perdas na produção relatadas no Canadá foram de 11.300 toneladas, em 1994 e 1,63 milhão de toneladas no EUA, em 2004, o que coloca essa doença em segundo lugar no ranking de importância em soja nos dois países (WRATHER; KOENNING, 2006).

### **2.3 Sintomatologia da doença**

O fungo *S. sclerotiorum*, causador da doença conhecida por mofo-branco, em diversas culturas, tem causado danos em grande escala, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. O fitopatógeno ocasiona danos pelo estrangulamento do colo em plântulas ou pela seca de ramos em plantas adultas, levando à morte em ambos os casos. É um patógeno que infecta as plantas invadindo o espaço inter e intracelular e provocando a formação de manchas aquosas, com conseqüente murcha e morte das plantas (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

Geralmente, a infecção por *S. sclerotiorum* se inicia na junção do pecíolo com a haste, cerca de 10 a 15 cm do solo, onde flores, folhas e demais tecidos senescentes ficam retidos sob a temperatura amena e a alta umidade, condições que favorecem o fungo (OLIVEIRA, 2005).

Os sintomas caracterizam-se por crescimento do micélio branco, com lesões inicialmente encharcadas que se espalham rapidamente para haste, ramos, folhas e vagens e que, com o passar do tempo, adquire coloração de chocolate a amarronzada. Em poucos dias, parte do micélio transforma-se em uma massa negra, rígida, denominada de escleródios, que é a forma de resistência do fungo.

Ele é composto por camadas distintas, ou seja, uma parede grossa rica em melanina, responsável pela coloração negra dos escleródios, uma parede fina (córtex) e a medula branca (micélio dormente do fungo). Os escleródios variam, em tamanho, de poucos milímetros a alguns centímetros e são formados tanto na superfície como no interior da haste e das vagens infectadas. A folhagem acima da região afetada pode murchar ou amarelecer. As sementes atacadas perdem o brilho, tornam-se opacas e de peso reduzido. O período crítico da doença vai do florescimento até a formação e enchimento das vagens (MICHEREFF, 2009).

A invasão dos tecidos pelas hifas se dá pela secreção de ácido oxálico e outras enzimas, como a poligalacturonase. O ácido oxálico atua como supressor da explosão oxidativa em plantas hospedeiras, desativando um dos mecanismos mais importantes de resistência de plantas a patógenos (CESSNA et al., 2000).

O ácido oxálico secretado pelo patógeno tem pH ácido, próximo de 4, o que favorece a degradação da parede celular nos tecidos infectados, pois maximiza a atividade de enzimas degradantes. Além disso, remove íons de cálcio vinculados a pectinas, expondo as células hospedeiras às enzimas catabólicas do fungo (BATEMAN; BEER, 1965).

De acordo com Guimarães e Stotz (2004), o ácido oxálico causa sintomas de ressecamento foliar por perturbação das funções das células guarda dos estômatos, responsáveis pela regulação osmótica, além de interferir no hormônio ABA, induzindo a abertura estomática.

## **2.4 Ciclo da doença e epidemiologia**

No Brasil, o mofo-branco tem adquirido importância devido a recentes epidemias ocorridas na cultura da soja e no feijoeiro, principalmente em regiões onde ocorrem condições climáticas amenas na safra de verão (região sul,

chapada dos cerrados, acima de 800 m de altitude) ou, mesmo, em anos de ocorrência de chuvas acima da média.

Os escleródios do fungo apresentam duas formas de germinação: a miceliogênica, formando somente hifas e a carpogênica, produzindo apotécios. Para que ocorra a germinação carpogênica, os escleródios devem receber luz suficiente e temperatura entre 10°C e 25°C, caso contrário, só ocorre a germinação miceliogênica, de potencial epidêmico muito mais reduzido (BOLAND; HALL, 1987; HUANG; KOZUB, 1991; PHILLIPS, 1987). Segundo Huang & Chang (2003), para que ocorra a germinação miceliogênica do fungo, a temperatura deve ser em torno de 20±2°C e umidade relativa do ar acima de 90%. Alta temperatura e umidade relativa são prejudiciais para a sobrevivência de ascósporos.

A infecção da planta pode ocorrer através de micélio ou ascósporos, ou seja, os escleródios germinam, produzindo apotécios que liberaram os ascósporos. Cada escleródio pode produzir de 1 a mais de 20 apotécios. Cada apotécio pode liberar mais de 2.000.000 de ascósporos, durante um período de 5 a 10 dias. Essas características demonstram o grande poder reprodutivo de *S. Sclerotiorum* e o perigo do aumento do inóculo, podendo, assim, infestar áreas de produção de culturas (PAULA JÚNIOR et al., 2008; STEADMAN, 1983).

A alta capacidade de reprodução, por meio da formação de escleródios com capacidade de sobreviver por longo período de tempo, torna estas estruturas de resistência um dos componentes centrais na epidemiologia desse patógeno.

O fungo requer uma fonte exógena de energia para que os ascósporos infectem folhas, vagens e hastes (DOMASCH; GANS; ANDERSON, 1980; STEADMAN, 1983). Adicionalmente, a infecção ocorre diretamente via cutícula, com a formação de apressórios, exceto quando a penetração ocorre via estômatos em alguns hospedeiros.

## 2.5 Métodos de controle do mofo-branco

O controle do mofo-branco é uma tarefa difícil devido à grande gama de hospedeiros do patógeno e em razão de formar estruturas de resistência, os escleródios, que podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo na ausência das espécies suscetíveis (PHILLIPS, 1989). Práticas de manejo, como uso de sementes sadias, plantio precoce, preparo do solo, rotação de cultura, formação de palhada, controle biológico com antagonistas, espaçamento entre linhas e densidade de plantas, contribuem para redução na severidade de *S. sclerotiorum*, mas a eficácia dessas medidas pode ser muito limitada (MUELLER; DORRANCE; DERKSEN, 2002; STEADMAN, 1979).

Segundo Paula Júnior et al. (2008), a principal via de entrada do fungo em uma área isenta é por meio das sementes. Portanto, a primeira providência para evitar a doença é empregar sementes sadias no plantio e tratá-las com fungicida adequado, considerando que, uma vez presente na área, é praticamente impossível sua erradicação.

Embora a resistência parcial contra este patógeno tenha sido observada em alguns genótipos de girassol (*Helianthus annuus*) (GODOY et al., 2005), feijão (*Phaseolus vulgaris*) (GILMORE et al., 2002), ervilha (*Pisum sativum*) (PORTER et al., 2009), amendoim (*Arachis hypogea*) (CRUICKSHANK; COOPER; RYLEY, 2002) e soja (*Glycine max*) (HARTMAN et al., 2000), a resistência completa neste patossistema não foi ainda relatada no campo.

### 2.5.1 Controle químico

Devido à falta de cultivares resistentes, a aplicação de fungicidas é uma das principais medidas para o manejo de *S. sclerotiorum*. Os fungicidas do grupo químico dos benzimidazóis, tais como tiofanato metílico e carbendazim,

têm sido amplamente utilizados em algumas regiões do mundo para aplicação foliares em plantas de soja e feijoeiro, principalmente na China, para o controle do mofo-branco, por mais de vinte anos (PAN; WANG; WU, 1997).

De acordo com Mueller, Dorrance e Derksen (2002), o controle químico do mofo-branco na cultura da soja pode ser ineficiente devido às dificuldades de se conseguir uma cobertura total da planta com os produtos. Colaboram para esta limitação as dificuldades de ajuste do momento correto da aplicação com a liberação de ascósporos, bem como dificuldades em atingir o terço inferior da planta, onde, normalmente, está a maioria das lesões do patógeno. Em alguns países, como Canadá, Suíça e Estados Unidos, são empregados sistemas de maior precisão para o controle da doença nas culturas de canola, amendoim e algumas hortaliças (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Na cultura da soja, Danielson, Nelson e Hems (2004) observou que infecções iniciadas em diferentes estádios fenológicos, seja R2 ou R5, provocam valores semelhantes de redução da massa de cem sementes. Mueller et al. (2004), nos anos de 1998, 1999 e 2000, trabalhando em doze ambientes, com diferentes cultivares de soja nos estados norte-americanos de Illinois, Ohio e Wisconsin, comprovaram que o tiofanato metílico não apresentou níveis significativos de controle de *S. sclerotiorum*, apenas maiores produtividades de grãos em alguns casos. Em anos com índice superior a 10% de mofo-branco, as parcelas tratadas em R1 e R3 (1,12 kg.ha<sup>-1</sup> de tiofanato metílico por aplicação) apresentaram índices de incidência maiores que a testemunha e menores produtividades de grãos. Costa e Costa (2004) concluíram, em condições controladas, que o fungicida vinclozolin inibiu 100% da germinação de estipes e apotécios e 60% da germinação miceliogênica, após 75 dias de incubação. O fungicida fluazinam permitiu a formação de estipes inviáveis e não foi eficiente na inibição miceliogênica. Já o fungicida tiofanato metílico reduziu, após 15 dias de incubação, 75% da germinação miceliogênica e não apresentou eficiência na

inibição da formação de apotécios, apresentando apenas diminuição do tamanho do estipe. O fungicida procimidone, aos trinta dias de incubação, inibiu 60% da germinação miceliogênica, mas não foi eficiente na inibição de estipes e apotécios. Estes resultados, frequentemente, não são observados em lavouras de feijão irrigadas, provavelmente devido ao fato de fungicida ser lavado rapidamente dos escleródios pelo intenso uso da irrigação.

Segundo Dann, Diers e Hammerschmidt (1999), o uso de herbicidas em níveis subtóxicos pode aumentar ou diminuir indiretamente a resistência das plantas às doenças. O uso do ingrediente ativo lactofen em soja induz a síntese e o acúmulo de uma fitoalexina, gliceolina, protegendo a cultura contra a doença, muito embora as reduções de produtividade de grãos devido a injúrias foliares causadas pela referida aplicação apresentem valores de 2,5% a 9,8%. O próprio rótulo do herbicida, nos Estados Unidos da América, indica que o mesmo pode ser usado no controle de mofo-branco (DANN; DIERS; HAMMERSCHMIDT, 1999). O glifosato, por sua vez, quando aplicado em subdoses, aumenta a severidade da doença devido à inibição da rota de síntese de fitoalexinas. Nos Estados Unidos, após a introdução de plantas transgênicas resistentes a glifosato, foi relatada maior ocorrência de *S. sclerotiorum* (LEE; PENNER; HAMMERSCHMIDT, 2000).

### **2.5.2 Controle biológico**

No contexto do controle biológico, doença é o resultado da interação entre hospedeiro, patógeno e diversos agentes não patógenos que também habitam o sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou induzir a resistência do hospedeiro em função das modificações ambientais (BETTIOL; GHINI, 1995). As modificações ambientais envolvem a

execução de práticas culturais para criar um ambiente favorável aos antagonistas e/ou resistência da planta hospedeira.

Em condições de campo, escleródios podem ser atacados e degradados por micoparasitas, como *Trichoderma* spp., *Coniothyrium minitans*, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Aspergillus* spp. e outros microrganismos, bem como animais, pássaros e insetos (BAE; KNUDSEN, 2007),.

O gênero *Trichoderma* (teleomorfo *Hipocrea*) é um fungo mitospórico, da classe *Hyphomycetes*, ordem *Hyphomycetales*, família *Moniliaceae*. Sua introdução como agente de biocontrole foi realizada por Persson, há mais de 200 anos. A espécie *Trichoderma harzianum* é um biorregulador e antagonista natural dos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia* spp., *Pythium* spp., *Alternaria* spp., *Armilaria mellea* e *Rosellinia* spp., entre outros. Atua como agente no controle biológico, diminuindo ou eliminando a necessidade do uso de fungicidas químicos, sendo considerado o mais efetivo agente biocontrolador para patógenos do solo (HARMAN, 2000).

Experimentos têm revelado o alto potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de *S. sclerotiorum*, relatando o enrolamento de hifas do antagonista sobre as hifas de *S. sclerotiorum*. Este processo resulta da degradação parcial da parede celular do patógeno em estágio mais avançado de parasitismo, confirmando os resultados obtidos por diversos autores (ETHUR et al., 2005; TSAHOURIDOU; THANASSOULOPOULOS, 2001). Este antagonismo pode ser decorrente da ação dos mecanismos de parasitismo, competição e produção de substâncias fungitóxicas, tais como antibióticos, e enzimas, que podem atuar isolada ou conjuntamente, afetando a integridade das células dos patógenos (DENNIS; WEBSTER, 1971).

*Trichoderma* spp. alimenta-se de nutrientes dos fungos parasitados e de material orgânico. Requer umidade para germinar, porém, não tolera

encharcamento. Como a velocidade de crescimento deste organismo é bastante alta, ele é capaz de estabelecer-se no solo e controlar diversas enfermidades (ESPOSITO & SILVA, 1998), fitopatógenos de solos, principalmente os que desenvolvem estruturas de resistência, como clamidósporos, escleródios e microescleródios (MENÊZES et al., 2007).

Estudos seguros e detalhados sobre a capacidade antagônica, habilidade de colonização e proliferação em diferentes habitats, associados a sistemas de produção massal, formulação e aplicação eficientes, têm levado ao desenvolvimento de produtos estáveis à base de *Trichoderma* (especialmente *T. harzianum*). Tais produtos, como RootShield, T-22 Planter Box e Trichodex, já encontram-se nos mercados dos Estados Unidos, Europa e Israel (HARMAN, 2000; LOBO JUNIOR, 2004).

O primeiro fungicida biológico com conídios de *T. harzianum* como ingrediente ativo registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil foi o produto Trichodermil, produzido pela empresa Itaforte Bioprodutos Agro-Florestais Ltda., Itapetininga, SP, para o controle de podridões radiculares do feijoeiro comum, causadas por *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani* (LOBO JUNIOR, 2004). Os conídios são os principais componentes viáveis da massa de *Trichoderma* spp. Por isso, qualquer produto comercial à base deste fungo deve conter uma grande proporção de conídios na sua formulação, pelo menos  $1 \times 10^7$  UFC (unidades formadoras de colônias) viáveis por grama de peso seco ou por mililitro de produto.

Existem outros antagonistas sendo estudados como alternativas para controle biológico de *S. sclerotiorum*. Na cultura da canola, em estudos realizados por Zhang (2004), utilizando 16 bactérias antagonistas a *S. sclerotiorum*, comprovou-se sua habilidade de supressão da doença por meio da produção de compostos voláteis (biossíntese de antibióticos) e indução de resistência na planta. Em estudos realizados *in vitro* foi demonstrado que solos

tratados com composto orgânico de resíduos de cultura puderam suprimir a germinação carpopôgica de *S. sclerotiorum* em adição à aplicação de micoparasitas, como *Coniothyrium minitans* (HUANG; ERICKSON, 2004).

## **2.6 Veiculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro**

Na cultura do feijoeiro, a obtenção de uma lavoura com população adequada de plantas depende da correta utilização de diversas práticas. O preparo adequado do solo, a semeadura na época correta em solo com boa disponibilidade hídrica, a utilização correta de herbicidas e a boa regulação das máquinas de semeadura (densidade e profundidade) são práticas essenciais, estando seu sucesso condicionado à utilização de sementes de boa qualidade. Todavia, frequentemente, a semeadura não é realizada em condições ideais, o que resulta em sérios problemas na emergência, havendo, muitas vezes, a necessidade de replantios (MACHADO, 2000; HENNING, 2005).

A associação de microrganismos com sementes é de fundamental importância devido aos danos que eles podem provocar às plantas oriundas destas, além de afetar a quantidade e a qualidade do produto final. Estruturas do patógeno presentes nas sementes constituem o inóculo primário para o desenvolvimento de epidemias e este inóculo fica viável por um longo período, quando estas sementes são armazenadas (MACHADO, 1988).

O uso de sementes com qualidade fisiológica e sanitária, ou dentro dos padrões de tolerância estabelecidos para as principais culturas e doenças, está entre as estratégias mais eficazes para diminuir a disseminação de patógenos. A comercialização de sementes não certificadas e/ou não recomendadas de uma região ou de um estado para outro, tem sido um dos fatores responsáveis pela disseminação de patógenos como *S. sclerotiorum*. Este patógeno pode ser

transmitido pelas sementes, associado às mesmas na forma de micélio dormente ou acompanhando o lote por meio das estruturas de resistência, que podem permanecer viáveis no solo por até cerca de 10 anos (PARISI; PATRÍCIO; OLIVEIRA, 2006).

As sementes infectadas têm um papel muito importante como agente de disseminação e como introdução da doença no campo. As propostas de padrões de tolerância recomendam o valor zero para as diferentes classes de certificação das sementes de feijão, ou seja, no Brasil, não se admite a presença do patógeno junto às sementes, seja na forma de contaminação concomitante, através dos escleródios ou da infecção das sementes por meio de micélio (OLIVEIRA, 2005).

O tratamento de sementes com fungicidas é uma prática que oferece garantia adicional ao estabelecimento da lavoura a custos reduzidos (MACHADO, 2000).

Além de controlar patógenos importantes transmitidos pelas sementes, o tratamento de sementes é uma prática eficiente para assegurar populações adequadas de plantas, quando as condições edafoclimáticas durante a semeadura são desfavoráveis à germinação e à rápida emergência, deixando-as expostas por mais tempo a fungos habitantes do solo, como, por exemplo, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. (*A. flavus*), *Pythium* spp. e *S. sclerotiorum* que, entre outros, podem causar a morte de plântulas (JULIATTI; VILELA, 2009; REIS; REIS; FORCELINI, 2007).

O tratamento de sementes também é de fundamental importância para evitar a introdução de *S. sclerotiorum* em áreas de cultivo. Fungicidas do grupo dos benzimidazóis, associados a produtos protetores, devem ser adotados como medida de segurança para reduzir a possibilidade de disseminação e transmissão do fungo por meio de micélio dormente (LEITE, 2005).

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 896-899, 1979.
- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos, 2009. 497 p.
- ARAÚJO, G. A. A. Preparo do solo e plantio. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 99-122.
- BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 21-24, Mar. 2007.
- BATEMAN, D. F.; BEER, S. V. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase using pathogenesis by *Sclerotinia rolfsii*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 55, n. 2, p. 204-211, 1965.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. p. 717-727.
- BIANCHINI, A. et al. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 333-349.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Epidemiology of white mold of white bean in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 9, n. 2, p. 218-224, Apr. 1987.
- \_\_\_\_\_. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 1, p. 93-108, Feb. 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, n. 1, p. 1-16, Feb. 2006.

BRAGANTINI, C. Produção de sementes. In: ARAÚJO, R. S. et al. (Coord.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. p. 639-667.

CARDOSO, J. E. Fungos de solo na cultura do feijoeiro irrigado. In: FANCELLI, A. L. (Ed.). **Feijão irrigado**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1990. p. 61-70.

CARNEIRO, F. F. **Genética da resistência do feijoeiro ao mofo branco e uso de retrocruzamento assistido por marcadores microssatélites**. 2009. 84 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CESSNA, S. G. et al. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 11, p. 2191-2199, Nov. 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, 8º levantamento**. Brasília, 2011. 46 p.

COSTA, G. R.; COSTA, J. L. S. Efeito da aplicação de fungicidas no solo sobre a germinação carpogênica e miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 133-138, 2004.

CRUICKSHANK, A. W.; COOPER, M.; RYLEY, M. J. Peanut resistance to *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 53, n. 10, p. 1105-1110, Aug. 2002.

DANIELSON, G. A.; NELSON, B. D.; HELMS, T. C. Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 3, p. 297-300, Mar. 2004.

DANN, E. K.; DIERS, B. W.; HAMMERSCHMIDT, R. Suppression of *Sclerotinia* stem rot of soybean by lactofen herbicide treatment. **Phytopathology**, Lancaster, v. 89, n. 7, p. 598-602, 1999.

DELGADO, G. V. et al. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. *in vitro*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 10., 2007, Brasília. **Resumos...** Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 1 CD-ROM.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma: I., production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 57, p. 25-39, 1971.

DI STEFANO, J. G.; LOBO JÚNIOR, M. A construção da planta e o manejo de doenças causadas por patógenos de solo, na cultura do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 121-123, mar./abr. 2003.

DOMASCH, K. H.; GANS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic, 1980. 869 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro comum na região central-brasileira**. 21. ed. Goiânia, 2006. 139 p.

\_\_\_\_\_. **Tecnologias de produção de soja: Paraná 2005**, sistema de produção. Londrina, 2004. 224 p.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and enviromental application of the genus Trichoderma. **Critical Review in Microbiology**, London, v. 24, n. 1, p. 89-98, Jan. 1998.

ETHUR, L. Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 127-133, jan./fev. 2005.

FERDINANDO, G. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 469 p.

FERRAZ, L. C. L. et al. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 131-135, jan./fev. 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Faostat**. Rome, 2005. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

GILMORE, B.; MYERS, J. R.; KEAN, D. Completion of testing of *Phaseolus coccineus* plant introductions (PIs) for white mold, *Sclerotinia sclerotiorum*, resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 45, n. 1, p. 64-65, 2002.

GODOY, M. et al. Sclerotinia resistance in sunflower: genotypic variations of hybrids in three environment of Argentina. **Euphytica**, Wageningen, v. 145, n. 1, p. 147-154, Jan. 2005.

GUIMARÃES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Pathology**, Oxford, v. 136, n. 3, p. 3703-3711, 2004.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 4, p. 377-393, Apr. 2000.

HARTMAN, G. L. et al. Evaluation of perennial Glycine species for resistance to soybean fungal pathogens that cause Sclerotinia stem rot and sudden death syndrome. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 2, p. 545-549, Mar./Apr. 2000.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2005. 51 p. (Documentos, 264).

HUANG, H. C.; CHANG, C. Effect of relative humidity on myceliogenic germination of Sclerotia of *Sclerotinia minor*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 12, n. 1, p. 65-68, June 2003.

HUANG, H. C.; ERIKSON, R. S. Effect of soil treatment of fungal agents on control of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* in canola and sunflower fields. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 13, n. 1, p. 1-6, Feb. 2004.

HUANG, H. C.; KOZUB, G. C. Temperature requirements for carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Beijing, v. 32, n. 4, p. 279-286, Oct. 1991.

JULIATTI, F. C.; VILELA, F. K. J. Eficiência do (tiofanato metílico + fluazinam 350+52.5) (certeza) no tratamento de sementes de algodão visando o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 7., 2009, Foz do Iguaçu. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2009. p. 1055-1060.

LEE, C. D.; PENNER, D.; HAMMERSCHMIDT, R. Influence of formulated glyphosate and activator adjuvants on *Sclerotinia sclerotiorum* in glyphosate-resistant and susceptible *Glycine max*. **Weed Science**, Lawrence, v. 48, n. 6, p. 710-715, 2000.

LEITE, R. M. V. B. de C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja.** Londrina: EMBRAPA/CNPQ, 2005. 3 p. (Circular Técnica, 76).

LOBO JÚNIOR, M. **Controle biológicos de patógenos habitantes do solo (*Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*), causadores de podridões radiculares no feijoeiro comum:** relatório de atividades de Cooperação Embrapa Arroz e Feijão. Itaforte: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2004. 4 p.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes:** fundamentos e aplicações. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107 p.

\_\_\_\_\_. **Tratamento de sementes no controle de doenças.** Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138 p.

MENÊZES, J. E. et al. **Avaliação de sementes de milho no cultivo de *Trichoderma* spp.** Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 4 p. (Circular Técnica, 56).

MEYER, M.; CAMPOS, H. D. Guerra ao mofo. **Revista Cultivar**, Pelotas, n. 120, p. 16-18, 2009.

MICHEREFF, S. J. **Doenças causam sérios prejuízos na safra de feijão em Pernambuco.** Recife: UFRPE, 2009. Disponível em: <[http://www.ufrpe.br/artigo\\_ver.php?idConteudo=1251](http://www.ufrpe.br/artigo_ver.php?idConteudo=1251)>. Acesso em: 7 maio 2011.

MUELLER, D. S.; DORRANCE, A. E.; DERKSEN, R. C. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of sclerotinia stem rot on soybean. **Plant Disease**, Quebec, v. 86, n. 1, p. 26-31, Jan. 2002.

MUELLER, D. S. et al. Application of thiophanate-methyl at different host growth stages for management of *Sclerotinia* stem rot in soybean. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, n. 10, p. 983-988, Feb. 2004.

OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. **DBO Agrotecnologia**, São Paulo, v. 2, n. 4, p. 8-13, 2005.

PAN, Y. L.; WANG, Z.; WU, Z. H. Resistance to carbendazim in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Chinese Journal of Oil Crop Science**, Beijing, v. 19, n. 1, p. 67-68, 1997.

PARISI, J. J. D.; PATRÍCIO, F. R. A.; OLIVEIRA, H. F. Método do rolo de papel toalha modificado para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 288-290, 2006.

PAULA JÚNIOR, T. J. et al. **Cultura do feijão**. Belo Horizonte: EPAMIG/CTZM, 2004. 52 p.

\_\_\_\_\_. **Manejo do mofo branco do feijoeiro**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2008. 4 p. (Circular Técnica, 13).

PEREIRA, G. V.; YOKOYAMA, L. P. Produção e uso de sementes de feijão no Estado de Goiás. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 6., 1999, Salvador. **Resumos...** Salvador: UFBA, 1999. p. 580-583.

PHILLIPS, A. J. L. Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*: a review. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 19, n. 2, p. 279-283, 1987.

\_\_\_\_\_. Fungi associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in South Africa and their effects on the pathogen. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 21, n. 1, p. 135-139, 1989.

PORTER, L. D.; HOHEISEL, G.; COFFMAN, V. A. Resistance of peas to *Sclerotinia sclerotiorum* in the Pisum core collection. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 58, n. 1, p. 52-60, Feb. 2009.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; FORCELINI, C. A. **Manual de fungicidas**: guia para o controle químico de doenças de plantas. Passo Fundo: UPF, 2007. 153 p.

SARTORATO, A. et al. Principais doenças transmitidas pela semente. In: VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. (Ed.). **Sementes de feijão**: produção e tecnologia. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2000. p. 147-199.

STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 904-907, 1979.

STEADMAN, J. R. White mold: a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, Quebec, v. 67, n. 2, p. 346-350, 1983.

TSAHOURIDOU, P. C.; THANASSOULOPOULOS, C. C. *Trichoderma koningii* as potential parasite of sclerotia of *Sclerotinia rolfii*. **Cryptogami Mycology**, Berlin, v. 22, n. 4, p. 289-295, 2001.

WRATHER, J. A.; KOENNING, S. R. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003-2005. **Journal of Nematology**, College Park, v. 38, n. 1, p. 173-80, Feb. 2006.

ZHANG, Y. **Biocontrol of sclerotinia stem rot of canola by bacterial antagonists and study of biocontrol mechanisms involved**. 2004. 149 p. Thesis (Ph.D. in Plant Science) - University of Manitoba, Manitoba, 2004.

## CAPÍTULO 2

### **Avaliação da sensibilidade *in vitro* de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* a fungicidas**

#### **RESUMO**

O controle químico e o controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* têm sido métodos dos mais empregados para o manejo do mofo-branco em diversas culturas, reduzindo, com isso, os danos na qualidade e na produtividade de grãos. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a sensibilidade *in vitro* de isolados de *S. sclerotiorum* a alguns fungicidas químicos e um biológico, comumente encontrados no mercado para tratamento de sementes de feijão e outras espécies vegetais. Foram estabelecidos como tratamentos: testemunha, tiofanato metílico, fluazinam, piraclostrobina, fluquinconazol, procymidone e *Trichoderma harzianum*, em 5 concentrações (5, 10, 50, 100 e 500 ppm) e 5 repetições. Os fungicidas foram misturados em meio de cultura BDA em fase líquida e adicionados a cada placa de Petri 20 mL da solução BDA + fungicida/antagonista. Após a solidificação do meio, foi depositado, no centro de cada placa de Petri, um disco de 0,6 cm de diâmetro contendo micélio do fungo e avaliado o índice de velocidade de crescimento micelial, para a obtenção do gráfico de correspondência entre esta variável e as concentrações dos produtos. Os fungicidas e o antagonista utilizados foram eficazes em reduzir o crescimento micelial dos dois isolados do fungo, havendo variações entre os isolados testados. Em relação à produção de escleródios, os maiores números desses propágulos foram observados na testemunha, nos tratamentos piraclostrobina e tiofanato metílico, não havendo nenhuma unidade formada no tratamento referente ao antagonista, *T. harzianum*. Todos os escleródios produzidos foram capazes de germinar, independente das concentrações dos fungicidas.

Palavras-chave: Controle químico. *Sclerotinia sclerotiorum*. Escleródios.

## ABSTRACT

The chemical and biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* are common measures for the management of white mold disease in different cultures, being able to reduce damages to yield and seed quality. In this work the objective was to evaluate the sensitivity of isolates of *S. sclerotiorum* to some chemical and biological products, commonly found in the market for seed treatment of bean and other plant species. The treatment design included the products: methyl thiophanate, fluazinam, pyraclostrobin, fluquinconazole, procymidone and *Trichoderma harzianum* in five concentrations (5, 10, 50, 100 and 500 ppm) and 5 replicates. Fungicides were mixed in PDA culture medium in the liquid phase, and poured to petri dishes, 20 ml of agar medium per dish. After solidification of the medium, 6 mm agar discs containing mycelium of the fungus were placed at the center of each dish. The mycelial growth was recorded daily to obtain the mean growth diameter, which was used to obtain the correlation curve between this variable and the products concentrations. The fungicide and antagonists were effective in reducing mycelial growth of both isolates, with variations among the isolates tested. In relation to the production of sclerotia, the greatest number of these propagules was observed in the control, pyraclostrobin and methyl thiophanate treatments and there was no unit formed for the antagonist, *T. harzianum*. All sclerotia produced were able to germinate regardless the concentrations of the fungicide.

Keywords: Chemical control. *Sclerotinia sclerotiorum*. Sclerotia.

## 1 INTRODUÇÃO

O controle do mofo-branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro, é uma tarefa difícil devido à ampla gama de hospedeiros do patógeno e, em razão de formar estruturas de resistência, os escleródios, que podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo na ausência das espécies suscetíveis (PHILLIPS, 1989). Práticas de manejo, como uso de sementes saudáveis, plantio precoce, preparo do solo, rotação de cultura, formação de palhada, controle biológico com antagonistas, controle químico, espaçamento entre linhas e densidade de plantas, contribuem para uma redução na severidade de *S. sclerotiorum*, mas a eficácia dessas medidas pode ser limitada (MUELLER; DERKSEN; OZKAN, 2002; STEADMAN, 1979;).

Os fungicidas têm sido o método mais usado no controle de doenças causadas por *S. sclerotiorum* devido à falta de resistência genética em suas hospedeiras (BARDIN; HUANG, 2001). Contudo, o uso contínuo destes produtos é preocupante quanto ao desenvolvimento de variantes do patógeno resistentes a eles, que estão disponíveis no mercado. O desenvolvimento de resistência ao fungicida benomil por isolado de *Sclerotinia* spp. nas culturas de alface e amendoim foi reportado por Mueller; Derksen e Ozkan (2002). Hubbard; Subbarão e Koike (1997) atribuíram falha no controle de *S. minor* pelo surgimento de resistência deste fungo a fungicidas. Testes realizados com 91 isolados de *S. sclerotiorum* indicaram potencial para resistência a tiofanato metílico (MUELLER; DERKSEN; OZKAN, 2002). Redução da eficácia de benzimidazóis no controle do mofo-branco tem sido observada em muitos campos de cultivo e isso tem sido atribuído ao surgimento de novas populações de *S. sclerotiorum* com resistência a esses produtos (LI; ZHOU, 2004).

Segundo Lu (2003), existem vários produtos químicos sendo utilizados no controle da doença, no entanto, apesar do uso expansivo, o controle não é

efetivo nem seguro ao meio ambiente. Para algumas culturas, como o feijoeiro, já estão registrados treze fungicidas para o controle do mofo-branco, aplicados preventivamente ou curativamente na parte aérea das plantas, e/ou via tratamento de sementes (AGROFIT, 2011).

O controle biológico tem sido considerado uma alternativa estratégica de controle para *S. sclerotiorum* (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006), sendo necessária sua execução no estágio de sobrevivência do fungo, ou seja, quando os escleródios encontram-se em repouso na superfície do solo, com pouca mobilidade ou no estágio de germinação, durante o qual o patógeno está mais vulnerável no ambiente. Adams e Ayers (1979) estabeleceram que o maior componente significativo do solo que afeta a sobrevivência do escleródio apresenta-se na microbiota. Enquanto os fungicidas apresentam somente um efeito temporário e usualmente necessitam aplicações repetidas durante o período de crescimento da cultura, os agentes de controle biológico são capazes de estabelecer-se, colonizar e de se reproduzirem no ecossistema (ÁVILA et al., 2005).

A supressão da doença por meio de agentes de biocontrole se manifesta na interação entre a planta, o patógeno, o agente de biocontrole, a comunidade microbiana sobre e ao redor da planta e o ambiente físico em questão (HANDESMAN; STABB, 1996). O agente de controle biológico *Trichoderma harzianum* tem sido estudado com maior frequência no controle da *S. sclerotiorum* em diversas culturas de interesse econômico ao redor do mundo, tendo em vista a necessidade de se produzir alimentos mais saudáveis, com baixa percentagem de resíduos de agroquímicos e reduzido custo de produção na lavoura.

Embora existam inúmeros trabalhos relacionados ao controle deste patógeno, nem sempre os produtos defensivos e suas respectivas concentrações são utilizados de maneira correta. Assim, este trabalho foi realizado com o

objetivo de avaliar a sensibilidade *in vitro* de dois isolados de *S. sclerotiorum* a alguns fungicidas, cuja eficácia no controle deste patógeno tem sido demonstrada, tanto na forma de aplicações da parte aérea das plantas como por meio do tratamento de sementes.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia (DFP), na Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizada no município de Lavras, MG, no primeiro semestre de 2011.

### **2.1 Obtenção e multiplicação do inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum***

Para este ensaio foram utilizados dois isolados de *S. sclerotiorum* dos municípios de Campo Verde, MT (CMLAPS 246) e Cristalina, GO (CMLAPS 05), pertencentes à Coleção de Culturas da Micoteca do Laboratório de Patologia de Sementes do DFP/UFLA.

O inóculo inicial, constituído de escleródios, foi submetido à desinfestação por imersão rápida em álcool 70% e, em seguida, os escleródios foram transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto e, finalmente, lavados com água destilada e esterilizada por 30 segundos. Após este procedimento, foram colocados três escleródios de cada isolado em placas de Petri (15 cm de diâmetro) contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA), totalizando quatro placas por isolado. As placas foram fechadas com filme PVC e levadas à câmara de incubação, à temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias. Após este período, retiraram-se, com auxílio de um perfurador de 0,6 cm de diâmetro, discos de micélio da margem das colônias dos isolados, transferindo-os para placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio BDA para obtenção de colônias puras. Todo manuseio foi realizado assepticamente em câmara de fluxo laminar. As colônias dos dois isolados, em cultura axênica, desenvolvidas em placas, constituíram as fontes primárias de inóculo para este ensaio.

## 2.2 Avaliação de fungicidas no crescimento micelial, produção e germinação de escleródios

Para a avaliação dos efeitos dos fungicidas no crescimento micelial dos isolados de *S. sclerotiorum*, foram selecionados os seguintes fungicidas: tiofanato metílico, fluazinam, piraclostrobina, fluquinconazol, procymidone e *Trichoderma harzianum*, nas dosagens de 5, 10, 50, 100 e 500 ppm (parte por milhão) e a testemunha sem fungicida. Os produtos utilizados neste trabalho foram fornecidos pelos seus fabricantes. Os fungicidas representam três grupos bem distintos no que tange ao aspecto de atuação nos tecidos dos vegetais alvos da aplicação destes produtos. Os fungicidas sistêmicos são representados pelos produtos tiofanato metílico e fluquinconazole; os de contato, representados por procimidone e fluazinam; o mesostêmico representado por piraclostrobina e o grupo biológico, constituído por formulação a base de *T. harzianum*.

A mistura de produto com o meio de cultura BDA foi realizada quando este ainda se encontrava em fase líquida, temperatura próxima de 45°C, após autoclavagem. Em cada placa de Petri de 9 cm de diâmetro foram adicionados 20 mL da mistura BDA + fungicida/antagonista, sendo este em suspensão concentrada emulsionável (SC) na concentração de  $2 \times 10^{12}$  conídios viáveis/L. Após a solidificação do meio, foi depositado, no centro de cada placa de Petri, um disco de 0,6 cm de diâmetro contendo micélio dos dois isolados de *S. sclerotiorum* utilizados, em separado.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e esquema fatorial 6x5, envolvendo seis fungicidas e cinco concentrações (5, 10, 50, 100 e 500 ppm) e mais a testemunha sem fungicida. Os tratamentos foram testados com dois isolados de *S. sclerotiorum*, CMLAPS 246 e CMLAPS 05. Cada parcela experimental foi composta de uma placa. Os dados foram transformados em raiz quadrada de  $Y + 1$ .

A medição do crescimento micelial foi realizada até o primeiro contato de uma das colônias do fungo com a borda da placa, medindo-se o diâmetro da área de crescimento micelial em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametricamente opostas).

Após 15 dias de cultivo em condições controladas, os escleródios produzidos nas placas contendo meio BDA com fungicida foram recolhidos, contados e mergulhados por 30 segundos na solução de hipoclorito de sódio na concentração de 2% e 30 segundos em água esterilizada, repetindo-se o processo por três vezes, conforme descrito por Delgado et al. (2007). Após esse procedimento, os escleródios foram colocados em novas placas com meio BDA para verificar o poder germinativo. Quatro placas foram separadas como testemunha, com escleródios que passaram pelo mesmo processo de lavagem, mas que não tiveram contato com os fungicidas. Foram colocados 4 escleródios em cada placa contendo meio BDA e mantidos à temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, por um período de sete dias.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Efeitos de fungicidas no crescimento micelial, produção e germinação de escleródios

Todos os fungicidas apresentaram, em geral, desempenho semelhante (Figuras 1 e 2). Na inibição do crescimento micelial dos dois isolados de *S. sclerotiorum*, observa-se que os fungicidas, incluindo o tratamento com *T. harzianum*, foram capazes de inibir, no mínimo, 87,3% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Ressalta-se a atuação semelhante e inibidora dos fungicidas procimidone e fluazinam para ambos os isolados de *S. sclerotiorum*, não havendo crescimento micelial na presença dos mesmos, independente das concentrações utilizadas. Isso confirma informações de trabalhos anteriores nesta linha de estudo, uma vez que estes produtos têm se mostrado mais eficazes, em geral, no controle do mofo-branco em algumas espécies hospedeiras.

Em relação ao desempenho dos fungicidas sistêmicos tiofanato metílico e fluquinconazole, observa-se que ambos os fungicidas posicionaram-se em um grupo intermediário com eficácia abaixo dos fungicidas protetores, procimidone e fluazinam, sendo superiores, em média, à piraclostrobina e ao produto biológico à base de *T. harzianum*.

Pela análise individual do desempenho dos produtos em relação ao crescimento dos dois isolados de *S. sclerotiorum*, percebe-se que houve uma variação acentuada entre os produtos e os isolados fúngicos testados, conforme ilustrado nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Na presença do fungicida tiofanato metílico, do grupo químico dos benzimidazóis, houve crescimento micelial de ambos os isolados de *S. sclerotiorum* em todas as concentrações do produto, tendo o isolado CMLAPS

05 apresentou um maior valor desta variável (Figura 3). O crescimento micelial na concentração de 5 ppm, para o isolado CMLAPS 05, foi de 10,8% superior ao crescimento do outro isolado (CMLAPS 246). Nas maiores concentrações do referido produto houve maior redução do índice de velocidade de crescimento micelial (Figura 1, 2 e 3). Resultado semelhante foi observado por Figueirêdo et al. (2010), em estudos sobre efeito do tiofanato metílico no controle *in vitro* de *S. sclerotiorum*, em que a menor concentração do ingrediente ativo (1 ppm) foi capaz de reduzir o crescimento micelial do patógeno em relação à testemunha. Em outro trabalho (MUELLER; DERKSEN; OZKAN, 2002), a eficácia deste produto na redução do crescimento de *S. sclerotiorum* foi observada a partir de concentração de 7µg/mL.

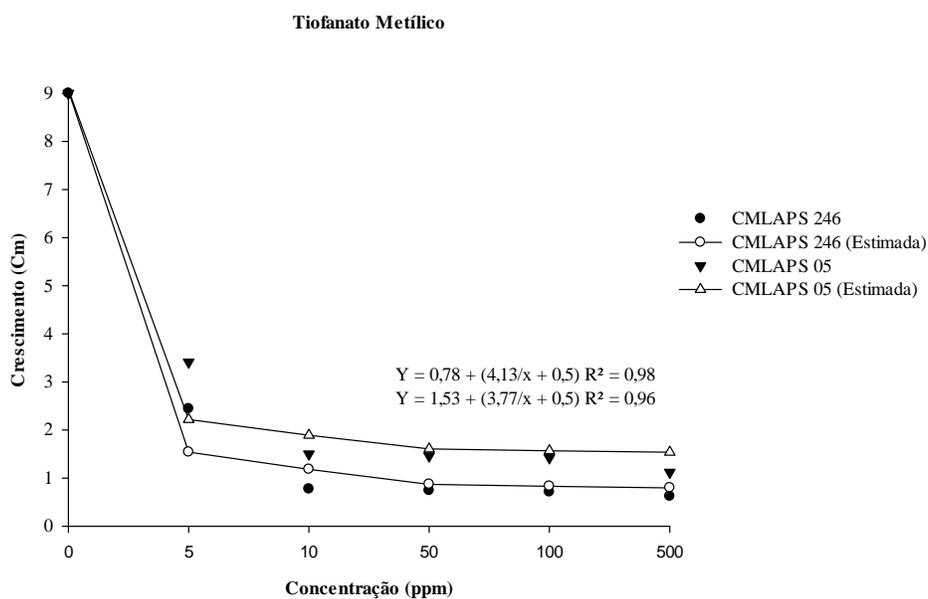


Figura 3 Crescimento micelial (Cm) dos isolados CMLAPS 246 e CMLAPS 05 na presença de Tiofanato Metílico em diferentes concentrações (ppm) do ingrediente ativo.

O fungicida procimidone, pertencente ao grupo químico das dicarboximidas e o fungicida fluazinam, do grupo fenilpiridinilamina, foram os tratamentos que mais inibiram o crescimento micelial de ambos os isolados do fungo, independente das concentrações (Figuras 1 e 2). Resultado semelhante foi observado em experimento realizado por Matheron e Porchas (2004), em que o fungicida fluazinam na concentração de 1,0 µg/mL foi capaz de inibir 100% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *S. minor*.

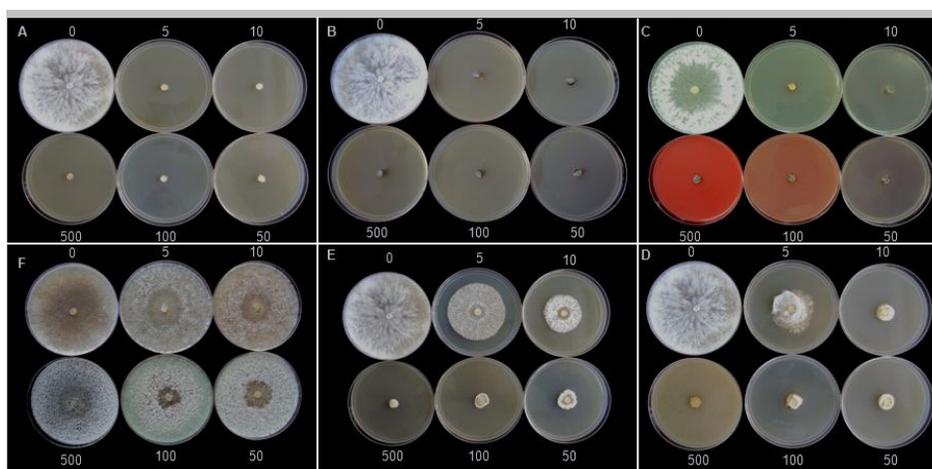


Figura 1 Inibição do crescimento micelial do isolado CMLAPS 05 de *S. sclerotiorum* submetido às concentrações de 5, 10, 50, 100 e 500 (ppm) dos fungicidas A) Procimidone, B) Fluazinam, C) Fluquinconazol, D) Tiofanato Metílico, E) Piraclostrobina e F) *Trichoderma harzianum*.

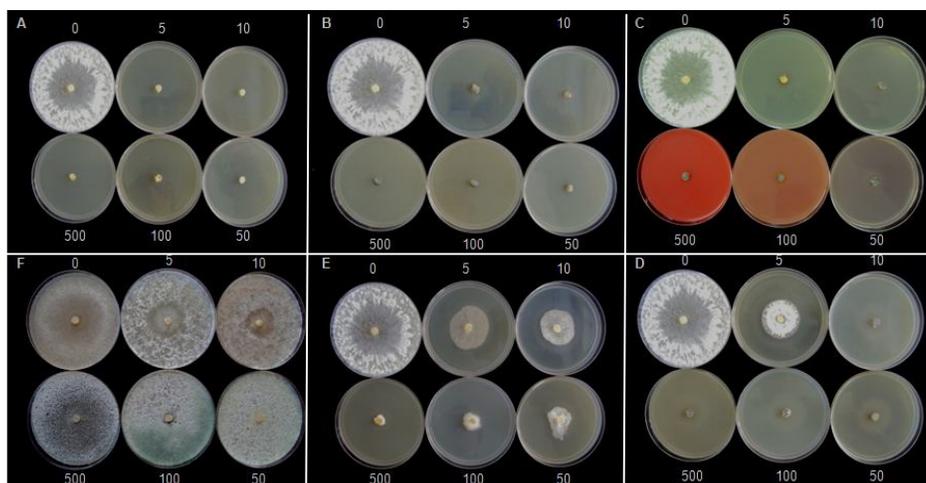


Figura 2 Inibição do crescimento micelial do isolado CMLAPS 246 de *S. sclerotiorum* submetido às concentrações de 5, 10, 50, 100 e 500 (ppm) dos fungicidas A) Procimidone, B) Fluazinam, C) Fluquinconazol, D) Tiofanato Metílico, E) Piraclostrobina e F) *Trichoderma harzianum*.

Em substrato contendo fluquinconazole, o isolado CMLAPS 246 apresentou crescimento micelial em todas as concentrações do produto (Figura 2), o que não ocorreu com o isolado CMLAPS 05 (Figuras 1 e 4), fato este que merece estudos posteriores mais detalhados com sementes de feijão. De acordo com Oliveira, Souza e Martins (2003), o fungicida propiconazole foi capaz de inibir completamente o crescimento de *Sclerotinia* spp., em três diferentes concentrações (150, 300 e 450 ppm).

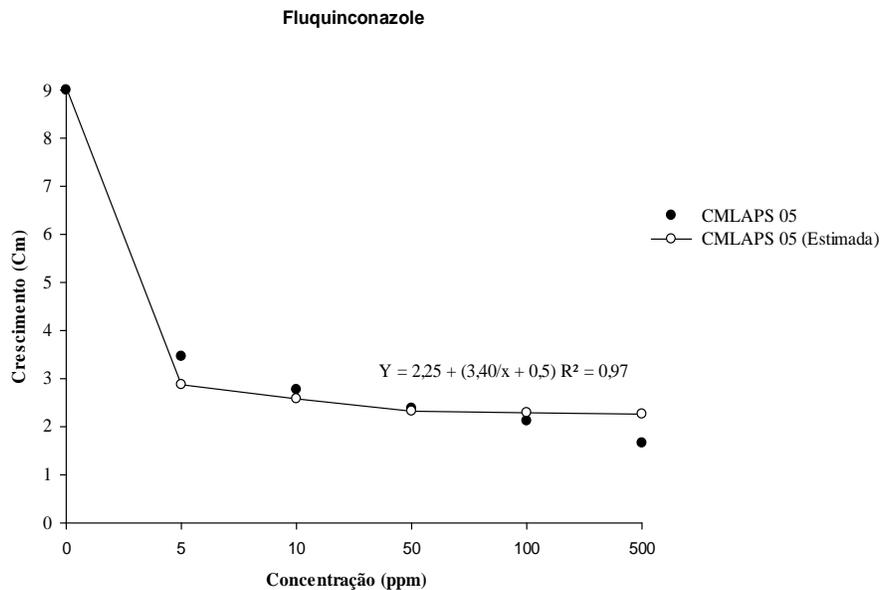


Figura 4 Crescimento micelial (Cm) do isolado e CMLAPS 05 na presença de Fluquinconazole em diferentes concentrações (ppm) do ingrediente ativo.

Em relação ao fungicida piraclostrobina, ambos os isolados do fungo apresentaram crescimento micelial, independente das concentrações do fungicida (Figura 1, 2 e 5). Quando comparados os índices de velocidade de crescimento micelial entre os isolados do fungo na presença de piraclostrobina, foi observado que o CMLAPS 05 apresentou um crescimento mais intenso do que o isolado CMLAPS 246. Conforme o aumento da concentração do fungicida, houve uma redução neste crescimento, ocorrendo maior desenvolvimento do fungo em relação aos outros fungicidas.

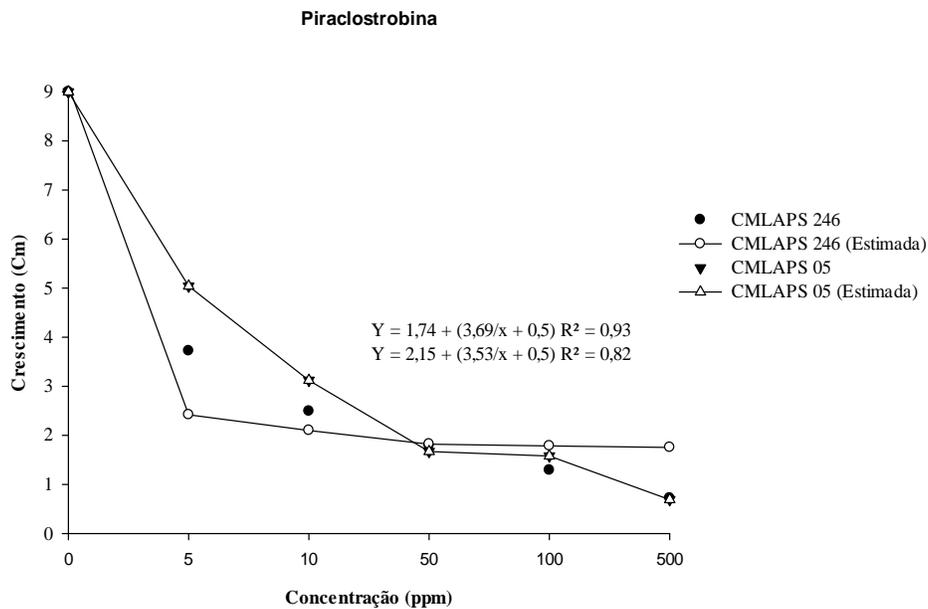


Figura 5 Crescimento micelial (Cm) dos isolados CMLAPS 246 e CMLAPS 05 na presença de Piraclostrobina em diferentes concentrações (ppm) do ingrediente ativo

Em relação ao fungicida biológico à base de *T. harzianum* (Figuras 1, 2 e 6), houve crescimento micelial de *S. sclerotiorum* apenas nos primeiros dias, porém, posteriormente, em razão do efeito de parasitismo e competição do antagonista, foi observada a inibição do referido patógeno, comprovando os resultados de outros autores (ABDULLAH; ALI; SULEMAN, 2008; MATROUDI; ZAMANI; MOTALLEBI, 2009) em relação a este antagonista. Em estudos de Delgado et al. (2007), diferentes isolados de *T. harzianum* apresentaram variação no que tange ao potencial de inibição do patógeno, embora todos os isolados tenham sido altamente antagonísticos. Dolatabadi et al. (2011) verificaram que, aos 2, 4 e 6 dias de incubação, o fungo *T. harzianum* causou máxima inibição no crescimento micelial de dois isolados de *S. sclerotiorum*, pelo método de pareamento.

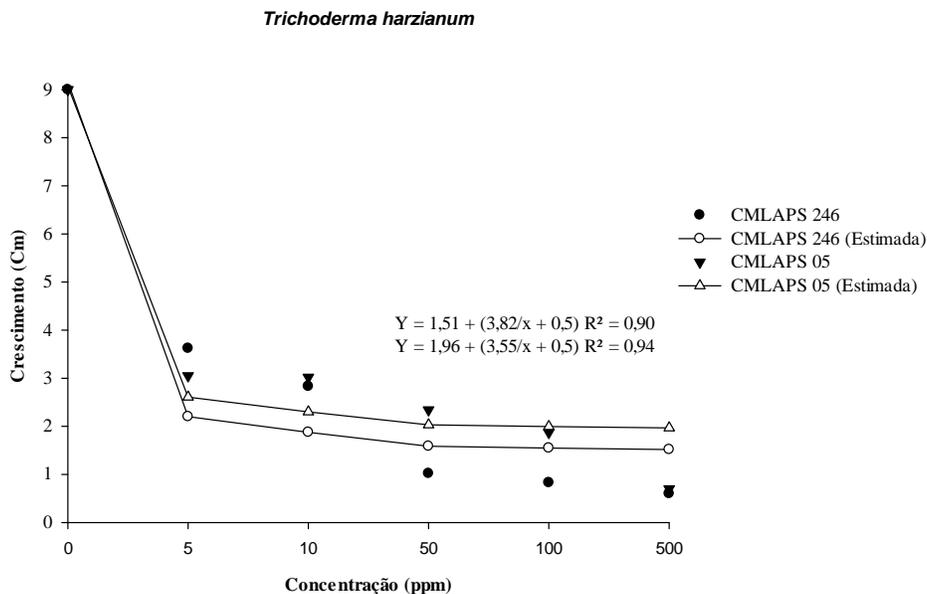


Figura 6 Crescimento micelial (Cm) dos isolados CMLAPS 246 e CMLAPS 05, na presença de *Trichoderma harzianum* em diferentes concentrações (ppm) do ingrediente ativo.

Na concentração mais baixa dos produtos testados, observa-se que, dos produtos sistêmicos, tiofanato metílico apresentou um desempenho levemente superior ao de fluquinconazole, não havendo, em nenhuma concentração destes produtos, a inibição completa dos dois isolados de *S. sclerotiorum* em teste. Em relação à piraclostrobina, ambos os fungicidas sistêmicos foram superiores nas faixas de concentração usadas. Em comparação com *T. harzianum*, os produtos sistêmicos apresentaram desempenho equivalente.

A produção dos escleródios dos dois isolados de *S. sclerotiorum* foi constatada em todos os tratamentos, havendo diferença significativa entre os fungicidas e as concentrações utilizadas neste experimento, exceto na concentração de 500 ppm (Tabela 1). A interação fungicidas x concentrações também foi significativa, segundo o teste F (ANEXO A). Em relação ao

tratamento testemunha (0 ppm), a produção média de escleródios foi de 33,2 unidades/placa de Petri para o isolado CMLAPS 05 e 36,3 unidades/placa no isolado CMLAPS 246. O tratamento biológico para ambos os isolados provocou a inibição do processo de formação dos escleródios, o que confirma resultados de Abdullah et al. (2008), conforme estudos *in vitro*. Segundo diversos pesquisadores (BARDIN; HUANG, 2001; DELGADO et al., 2007; ETHUR; CEMBRANEL; SILVA, 2001; KIM; KNUDSEN, 2009), a formação de escleródios por *S. sclerotiorum*, quando em contato com o antagonista, é variável, estando este processo relacionado com a agressividade de cada espécie e isolado de *Trichoderma* spp.

Em relação aos fungicidas, na concentração de 5 ppm, houve diferença significativa entre os tratamentos segundo o Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, observando-se uma maior produção de escleródios no tratamento piraclostrobina, seguido do tiofanato metílico, para ambos os isolados (Tabela 1). A menor produção de escleródios pelos dois isolados foi observada no tratamento procimidone. As concentrações de 10, 50 e 100 ppm apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, tendo havido formação de um maior número de escleródios no tratamento à base de piraclostrobina para os isolados, não havendo diferença entre os demais tratamentos.

Entre as concentrações (ppm) de cada tratamento fungicida para o isolado CMLAPS 05, houve diferença no número de escleródios na concentração de 5 ppm apenas para tiofanato metílico. O tratamento piraclostrobina nas concentrações de 5, 10, 50 e 100 ppm apresentou diferença significativa, com alta produção de escleródios nas menores concentrações. Já no tratamento procimidone, não houve diferença na formação de escleródios, independentemente das concentrações.

Tabela 1 Médias de produção de escleródios dos isolados CMLAPS 05 e CMLAPS 246 de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de diferentes concentrações de fungicidas. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>Isolado CMLAPS 05*</b>					
<b>Concentração (ppm)</b>					
<b>Tratamento</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>500</b>
Tiofanato Metílico	7,50 Cb	1,00 Aa	0,50 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Fluazinam	2,00 Ba	1,20 Aa	0,20 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Piraclostrobina	14,0 Dc	13,2 Bc	6,20 Bb	2,25 Ba	0,50 Aa
Fluquinconazol	2,75 Ba	1,50 Aa	1,00 Aa	1,00 Aa	0,70 Aa
Procimidone	0,50 Aa	1,20 Aa	0,20 Aa	0,70 Aa	0,00 Aa
<b>CV (%)</b>	<b>20,99</b>				
<b>Isolado CMLAPS 246*</b>					
<b>Concentração (ppm)</b>					
<b>Tratamento</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>500</b>
Tiofanato Metílico	7,00 Bb	0,50 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Fluazinam	1,70 Aa	1,20 Aa	0,50 Aa	0,50 Aa	0,00 Aa
Piraclostrobina	16,7 Cc	16,7 Bc	6,50 Bb	4,50 Bb	1,00 Aa
Fluquinconazol	2,00 Aa	1,00 Aa	1,00 Aa	1,00 Aa	1,00 Aa
Procimidone	0,70 Aa	1,00 Aa	1,00 Aa	1,00 Aa	0,20 Aa
<b>CV (%)</b>	<b>20,54</b>				

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula, para ppm, na coluna, e minúscula, para cada tratamento, na linha, não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Tukey, a 5%.

Em relação ao isolado CMLAPS 246, houve também diferença significativa entre os tratamentos, no que tange á formação de escleródios em todas as concentrações dos fungicidas testados, exceto na concentração de 500 ppm, segundo o Teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Tabela 1). Entre as concentrações de cada fungicida, houve diferença significativa apenas nos

tratamentos tiofanato metílico e piraclostrotrina. No primeiro, apenas na concentração de 5 ppm houve um maior número de escleródios e, no segundo, nas concentrações de 5 e 10 ppm. Nas concentrações mais elevadas daqueles produtos, a formação de escleródios foi menor.

De acordo com Henning et al. (2009), tanto procimidone quanto fluazinam, quando aplicados na parte aérea das plantas de soja, foram capazes de reduzir a produção de escleródios (g/m<sup>2</sup>), concordando com os resultados da sensibilidade destes fungicidas *in vitro*, conforme aumenta a concentração de cada um deles.

O teste de germinação realizado com os escleródios produzidos em colônias formadas na presença dos fungicidas em meio BDA revelou que houve germinação miceliogênica de todos esses propágulos, independente do tratamento e das concentrações. Em trabalhos com soja, conduzidos por Henning et al. (2009), escleródios de *S. sclerotiorum* formados na parte aérea de plantas que receberam aplicações dos fungicidas procimidone, fluazinam e tiofanato metílico apresentaram, posteriormente, germinação miceliogênica na proporção de 88,3%, 88,4% e 86,5%, respectivamente, comparado com a testemunha, com valor médio de 91,5%.

Com base nos resultados deste trabalho, percebe-se que o controle de *S. sclerotiorum* por meio de aplicação de fungicidas nos escleródios não apresenta a eficácia esperada. Isto faz com que outras medidas de manejo devam ser usadas, principalmente no intuito de impedir a formação de apotécios, que são os principais responsáveis pela maior disseminação do fungo em uma mesma lavoura.

#### 4 CONCLUSÕES

Todos os fungicidas, químicos e um biológico, mostraram-se eficazes em reduzir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em meio de cultura, cabendo aos produtos procimidone e fluazinan as maiores reduções médias do crescimento do fungo nas condições que este estudo foi conduzido.

Para ambos os fungicidas sistêmicos, tiofanato metílico e fluquinconazole, e para piraclostrobina e *T. harzianum* não foi observada redução completa do crescimento micelial da *S. sclerotiorum* em nenhuma das concentrações testadas.

O comportamento de *S. sclerotiorum*, com base em dois isolados, foi variável na presença de alguns dos produtos utilizados bem como das concentrações utilizadas.

Em relação à formação de escleródios, houve uma menor produção nas concentrações mais elevadas dos produtos testados, com exceção do fungicida biológico à base de *T. harzianum*, para o qual não houve a produção de escleródios.

A germinação dos escleródios de colônias formadas em meio BDA contendo fungicidas foi semelhante em todos os tratamentos, incluindo a testemunha.

## REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M. T.; ALI, N. Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 10, p. 1354-1359, Oct. 2008.
- ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 896-899, 1979.
- AGROFIT. **Sistema Agrofit**: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 10 maio 2011.
- ÁVILA, Z. R. et al. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotinia rofsii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 30 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 117).
- BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ottawa, v. 23, n. 1, p. 88-98, Feb. 2001.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2006.
- DELGADO, G. V. et al. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. *in vitro*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 10., 2007, Brasília. **Resumos...** Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 1 CD-ROM.
- DOLATABADI, K. H. et al. In vitro evaluation of arbuscular mycorrhizal-like fungi and *Trichoderma* species against soil borne pathogens. **Journal of Agricultural Science and Technology**, London, v. 7, n. 1, p. 73-84, Jan. 2011.
- ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; SILVA, A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 885-887, set./out. 2001.

FIGUEIRÊDO, G. S. et al. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 1, p. 1-9, 2010.

HANDESMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1855-1869, Oct. 1996.

HENNING, A. A. et al. **Avaliação dos princípios ativos para controle químico do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja: safra 2008/2009**. Curitiba: ABRATES, 2009. 3 p. (Informativo Técnico, 19).

HUBBARD, J. C.; SUBBARÃO, K. V.; KOIKE, S. T. Development and significance of dicarboximide resistance in *Sclerotinia minor* isolates from commercial lettuce fields in California. **Plant Disease**, Quebec, v. 81, n. 1, p. 148-153, Jan. 1997.

KIM, T. G.; KNUDSEN, G. R. Colonization of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia by a biocontrol isolate of *Trichoderma harzianum*, and effects on myceliogenic germination. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 1081-1085, Oct. 2009.

LI, H.; ZHOU, M. Rapid identification of carbendazim resistant strains of *Sclerotinia sclerotiorum* using allele-specific oligonucleotide (ASO)-PCR. **Scientia Agricultura Sinica**, Beijing, v. 37, n. 9, p. 1396-1399, Aug. 2004.

LU, G. Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in oilseed crops. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 2, n. 12, p. 509-516, Dec. 2003.

MATHERON, M. E.; PORCHAS, M. Activity of Boscalid, Fenhexamid, Fluazinam, Fludioxonil, and Vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. **Plant Disease**, Quebec, v. 88, n. 6, p. 665-668, June 2004.

MATROUDI, S.; ZAMANI, M. R.; MOTALLEBI, M. Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. **Egyptian Journal of Biology**, Cairo, v. 11, n. 1, p. 37-44, 2009.

MUELLER, D. S.; DERKSEN, R. C.; OZKAN, E. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. **Plant Disease**, Quebec, v. 86, n. 1, p. 26-31, Jan. 2002.

OLIVEIRA, C. F.; SOUZA, L. A. S.; MARTINS, A. N. Sensibilidade 'in vitro' dos Fungos *Alternaria* sp. e *Sclerotinia* sp. a fungicidas sistêmicos. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, ano 2, n. 3, p. 1-5, 2003.

PHILLIPS, A. J. L. Fungi associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in South Africa and their effects on the pathogen. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 21, n. 1, p. 135-139, 1989.

STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 904-907, 1979.

## CAPÍTULO 3

### **Relação entre potencial de inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum* e desempenho de sementes de feijão infectadas**

#### **RESUMO**

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente etiológico do mofo-branco em diversas culturas de importância econômica, tais como feijão, soja e algodão, é comumente disseminado através de sementes, sendo introduzido em áreas isentas, onde é capaz de causar elevadas perdas na qualidade de sementes e na produtividade, podendo seu inóculo se manter viável por vários anos. As sementes são um dos principais veículos de disseminação deste fungo tanto a curtas como a longas distâncias. Esta relação é, no entanto, pouco estudada e compreendida. Neste trabalho, o objetivo principal foi avaliar os efeitos do referido fungo em associação com sementes de feijão, sendo incluídos dois isolados do fungo e dois genótipos do feijão, com variações do potencial de inóculo inicial do patógeno em sementes infectadas artificialmente. Foram estabelecidos quatro potenciais de inóculo do fungo, com base no tempo de exposição das sementes a este organismo em desenvolvimento em meio BDA. As sementes foram semeadas em substrato de solo e o cultivo conduzido em condições favoráveis para o desenvolvimento do mofo-branco. Foram analisadas as variáveis germinação, sanidade (meio NEON), índice de velocidade de emergência, estande inicial e final, e peso de matéria seca da parte aérea e raiz. Em relação às variáveis analisadas, constatou-se que, com o aumento do potencial de inóculo nas sementes, houve uma redução gradual e correspondente dos valores de germinação, índice de velocidade de emergência, estandes, peso e altura de plantas e tamanho de raiz. Estes resultados evidenciam a importância do inóculo de *S. sclerotiorum* associado às sementes de feijão, tanto no que tange ao seu papel de disseminação da doença como em causar danos diretos no campo de cultivo, reduzindo o potencial produtivo das plantas emergidas.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*. Sementes. Potenciais de Inóculo.

## ABSTRACT

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of white mold in several economically important crops such as beans, soybeans and cotton, is commonly spread by seeds, being introduced into free areas, which can cause high losses in quality seeds and productivity, its inoculum can remain viable for several years. The seeds are a major vehicle for dissemination of this fungus both the short and long distances. This relationship is, however, poorly studied and understood. In this work the main objective was to evaluate the effects of the fungus in association with bean seeds and included both isolates and two bean genotypes, with the potential variations of the initial inoculum of the pathogen in artificially infected seeds. We established four potential inoculum of the fungus, based on time of exposure of seeds to the developing organism on PDA medium. The seeds were sown on soil and crops under favorable conditions led to the development of white mold. Variables were analyzed germination, health (through NEON), emergence rate index, initial and final stands, and dry weight of shoot and root. The variables analyzed, contacted that with the increase in inoculum potential in the seeds, there was a gradual and corresponding values of germination, emergence speed index, stands, plant height and weight and size of the root. These results highlight the importance of inoculum of *S. sclerotiorum* associated with seeds of beans, both with regard to their role of spreading the disease as to cause direct damage in the field of cultivation, reducing the productive potential of plants emerged.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*. Seeds. Potential inoculum.

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos principais componentes da dieta alimentar brasileira, sendo um alimento de consumo básico da população e importante fonte de proteínas. O cultivo dessa leguminosa é difundido em todo o território nacional, tanto por pequenos produtores descapitalizados como os mais tecnificados. O aumento das áreas cultivadas com feijão acarreta no mal uso de alguns fatores de produção, dentre estes sementes com baixa qualidade sanitária.

Dentre as principais doenças associadas ao feijoeiro, o mofo-branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é das mais destrutivas, sendo capaz de infectar inúmeras espécies de importância econômica para o Brasil, podendo ser fator limitante para o desenvolvimento destas. A importância desta doença é cada vez maior, considerando-se a participação expressiva do feijão no contexto sócio-econômico no agronegócio brasileiro, quando comparado com os demais países. *S. sclerotiorum* tem sido frequentemente responsável por prejuízos diretos e indiretos na forma de redução do volume e da qualidade da produção do feijão, além de reduzir a sustentabilidade de muitos cultivos em regiões onde ocorre.

A associação deste microrganismo com as sementes de feijoeiro é de fundamental importância devido aos danos que ele pode provocar às plantas no campo, associados à disseminação e à introdução da doença que causa em áreas isentas, além de afetar a quantidade e a qualidade do produto final. Segundo Machado (1988), as estruturas do patógeno presentes nas sementes constituem o inóculo primário para o desenvolvimento de epidemias e este fica viável por um longo período, quando as sementes são armazenadas.

Uma das medidas mais importantes de controle da doença é a utilização de sementes de qualidade sanitária e fisiológica, livres da presença de escleródios e de micélio no seu interior. Parisi, Patrício e Oliveira (2006)

salientam que o uso de sementes com boa qualidade fisiológica e sanitária, ou dentro dos padrões de tolerância estabelecidos para as principais culturas e doenças, está entre as mais eficazes medidas para diminuir a disseminação de patógenos, de forma que a comercialização de sementes não certificadas e/ou não recomendadas de uma região ou de um estado para outro tem sido um dos fatores responsáveis pela disseminação de patógenos como *S. sclerotiorum*. As propostas de padrões de tolerância recomendam o valor zero para as diferentes classes de certificação das sementes de feijão, ou seja, no Brasil, não se admitindo a presença do patógeno junto às sementes, seja na forma de contaminação concomitante, através dos escleródios, ou da infecção das sementes através de micélio (OLIVEIRA, 2005).

Na literatura, há poucos relatos sobre a importância da presença do micélio nas sementes na disseminação da doença quando este fungo está associado às sementes de espécies hospedeiras, como no caso do feijão. Tendo em vista o fato de que a severidade da doença no campo nem sempre apresenta correlação com a percentagem de sementes infectadas pelo patógeno e que mesmo plantas pouco afetadas podem apresentar grande número de sementes infectadas (LIMA et al., 1985), percebe-se que há uma carência de estudos sobre as relações entre este patógeno e as sementes colonizadas.

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de mensurar os efeitos da infecção de *S. sclerotiorum* na forma micelial a partir de sementes de feijão inoculadas artificialmente, bem como avaliar seu efeito na qualidade fisiológica e sanitária, decorrentes desta interação em condições controladas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia (DFP), na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

### **2.1 Obtenção e multiplicação dos isolados fúngicos**

Foram utilizados dois isolados de *S. sclerotiorum*, oriundos de sementes de feijão, produzidas na região de Lavras, MG, sendo (CMLAPS 02 - Isolado 1) e (CMLAPS 401- Isolado 2), pertencentes à coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes (CMLAPS). Os isolados foram multiplicados, inicialmente, em meio batata, dextrose e ágar (BDA), em placas de Petri, e incubados, a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas, durante cinco dias, em câmara incubadora tipo BOD. As culturas foram conservadas pelo método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967).

### **2.2 Perfil dos lotes de sementes utilizados**

Sementes de duas cultivares de feijão, 'Pérola', safra 2010/2011 (C1) e 'Ouro Negro', safra 2010/2011 (C2), foram submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio a 1%, durante 30 segundos, lavadas em água destilada e, em seguida, secas em câmara de fluxo laminar, sobre papel germitest, durante 48 horas. A qualidade sanitária e fisiológica inicial dos lotes foi determinada de acordo com os testes descritos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009b) e pelo Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009a). Parte

dessas sementes desinfestadas foi armazenada em câmara fria e seca (15°C e umidade de 50%), para os procedimentos de inoculação.

### **2.3 Preparo e inoculação das sementes**

As sementes foram inoculadas pela técnica de condicionamento fisiológico desenvolvida por Carvalho (1999), Costa et al. (2003) e Machado et al. (2001).

Para a inoculação, foram utilizadas placas de Petri de plástico, nas quais foi vertido meio BDA modificado osmoticamente pelo soluto manitol, com potencial hídrico de  $-1,0$  MPa, ajustado pelo software SPPM (MICHEL; RADCLIFFE, 1995).

Sobre o meio de ágar foram colocados discos de micélio dos isolados de *S. sclerotiorum*, sendo as placas mantidas em câmara de incubação à temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas, por cinco dias. Após o crescimento micelial do fungo, cobrindo toda superfície do substrato, as sementes desinfestadas foram distribuídas em camada única sobre a colônia fúngica, tomando-se o cuidado de manter a superfície da semente em contato com a superfície da colônia do fungo. Novamente, foram colocadas em câmaras de incubação, a 20°C e fotoperíodo de 12 horas, por diferentes períodos de contato com o fungo 36, 72 e 96 horas, correspondendo estes períodos aos diferentes potenciais de inóculo pré-estabelecidos (Tabela 1).

Tabela 1 Potenciais de inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum* em função do tempo de exposição das sementes à colônia fungica.

<b>Período de contato entre sementes e fungo (horas)</b>	<b>Potencial de inóculo</b>
36	P1
72	P2
96	P3

A título de referencial, uma testemunha foi preparada para cada tempo de incubação de sementes em substrato com o restritor hídrico na ausência de *S. sclerotium*.

Após cada período de contato, as sementes foram retiradas e submetidas à secagem, por 48 horas, em estufa com circulação forçada de ar, até atingirem grau de umidade de 12% e, em seguida, mantidas em câmara de armazenamento (15°C e 50% de UR), até sua utilização no ensaio.

#### **2.4 Avaliação da qualidade de sementes de feijão infectadas por *S. sclerotiorum*, em diferentes níveis de potencial de inóculo**

Para este ensaio, foram aplicados testes de desempenho fisiológico e sanitário, conforme já descrito para *S. sclerotiorum* e sementes de feijoeiro (BRASIL, 2009b). O teste de sanidade escolhido foi a incubação de sementes, inoculadas e não inoculadas, em meio semisseletivo ágar-bromofenol (NEON), com modificações conforme descrição em literatura (NAPOLEÃO et al., 2006; NASSER; ARANCIBIA; NAPOLEÃO, 1999; PERES, 1996). Neste caso, as sementes foram distribuídas em substrato agarizado (batata-dextrose-ágar) contendo 50 mg de cloranfenicol; 50 mg de azul de bromofenol e manitol -1,0 MPa. O pH final foi ajustado para 4,7, com HCl ou NaOH e todos os

componentes foram adicionados ao meio antes da autoclavagem. As placas foram distribuídas em câmara de incubação sob temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas. A partir do terceiro dia de incubação, todas as sementes foram examinadas no intuito de detectar ao seu redor a formação, ou não, de halos amarelo-avermelhados, indicativos da presença de *S. sclerotiorum*. As placas também foram analisadas no microscópio estereoscópico quanto ao crescimento de micélio característico e presença de escleródios de *S. sclerotiorum* (BRASIL, 2009b).

A ocorrência de *S. sclerotiorum* foi avaliada em 200 sementes inoculadas e não inoculadas, para cada potencial de inóculo (tempo de contato de sementes com o patógeno).

Para o teste de germinação em rolo de papel (BRASIL, 2009a), as sementes de feijão foram colocadas sobre uma folha de papel germitest, representada por 50 sementes, 200 sementes por tratamento e cobertas, posteriormente, por outra folha. O papel germitest foi previamente umedecido em água estéril e deionizada na quantidade de 2,5 vezes a massa do papel não hidratado. A seguir, as sementes contidas em rolos de papel foram levadas ao germinador com temperatura constante a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . As avaliações foram realizadas no quinto e no nono dia para feijão, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009b). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

Para o índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial, estande final, matéria seca da parte aérea e da raiz, foram semeadas 200 sementes de cada cultivar inoculadas e não inoculadas, em caixas de polietileno com dimensões de 48 x 29 x 10 cm, contendo areia e substrato comercial Tropstrato HA Hortaliças<sup>®</sup>, na proporção de 1:1. Após a semeadura, as sementes foram cobertas com uma camada de 3 cm do mesmo substrato. O ensaio foi conduzido em câmara de crescimento vegetal e a velocidade de

emergência das plântulas foi determinada pela contagem diária de plântulas emergidas. Foram consideradas emergidas as plântulas que apresentaram os cotilédones acima do nível do solo. A contagem foi feita até a estabilização do número dessas plantas, por leituras consecutivas a cada dois dias, realizadas até os 14 dias após a semeadura.

O índice de velocidade de emergência foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Maguire (1962):

$$IVE = \sum_{i=1}^n Ni/Di$$

em que

IVE - índice de velocidade de emergência;

Ni - número de plântulas emergidas na 1ª contagem, 2ª contagem,... enésima contagem, respectivamente;

Di - número de dias após semeadura na 1ª contagem, 2ª contagem, ... enésima contagem, respectivamente;

Os estandes, inicial e final, foram registrados aos 10 e aos 25 dias após a semeadura, sendo o valor absoluto transformado em porcentagem.

Os valores do peso de matéria seca foram obtidos 30 dias após a semeadura, por meio da pesagem de todas as plantas emergidas por repetição. Para avaliar o peso de matéria seca, as plantas foram cortadas dois centímetros acima da região do colo e submetidas ao processo de secagem em estufa com fluxo de ar forçado, à temperatura de 50°C. Após 96 horas, o material foi pesado em balança semianalítica e os resultados apresentados em gramas.

## **2.5 Análise dos dados**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições. A análise de variância foi realizada em esquema fatorial 3 x 2 x 3 (tempo de exposição das sementes, cultivares e isolados) no programa Sisvar<sup>®</sup> (FERREIRA, 2000). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) ou de regressão, de acordo com a natureza dos dados.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A associação de *Sclerotinia sclerotiorum* com sementes de feijão, embora seja alvo de algumas citações em literatura, não tem sido bem dimensionada, principalmente no que tange à intensidade de efeitos correlacionados com potencial de inóculo do fungo nas sementes infectadas de diferentes genótipos do hospedeiro em foco. O papel das sementes infectadas neste patossistema tem sido mais destacado no contexto epidemiológico, constituindo as sementes um dos principais meios de disseminação e introdução da doença em regiões de plantio.

Neste estudo, a atuação de *S. sclerotiorum*, em associação com sementes de feijão de ambas as cultivares usadas, pode ser considerada das mais drásticas, causando reduções do percentual de germinação em níveis progressivos e acentuados na medida do aumento do potencial de inóculo presente inicialmente nas sementes plantadas (Tabela 2, ANEXO B), sabendo-se que o percentual de germinação inicial do lote de sementes de feijão cultivar Pérola foi de 99,5% e de 99,0% para a cultivar Ouro Negro. No potencial de inóculo mais elevado (P3), a redução do percentual de germinação para os isolados foi, em média, próximo de 71% e 84%, para ‘Pérola’ e ‘Ouro Negro’, respectivamente, havendo diferença de comportamento entre as cultivares para cada isolado. A exemplo de outros patossistemas citados na literatura, nota-se que *S. sclerotiorum* é um patógeno que pode provocar reduções acentuadas de estande no cultivo do feijoeiro, colocando-se ao lado do grupo daqueles patógenos que são destacados por este tipo de efeito em outras espécies vegetais.

Em relação à atuação dos dois isolados usados neste estudo, observa-se que um deles S1 foi mais agressivo ao feijoeiro no potencial de inóculo mais elevado (Tabela 2). Nos demais potenciais de inóculo não houve diferenças entre os dois isolados. A redução média do percentual de germinação neste

experimento foi acima de 77%, o que demonstra a agressividade deste patógeno na forma micelial a partir das sementes infectadas. Em se tratando de um organismo de solo, percebe-se que o uso de sementes infectadas pode causar acúmulo de inóculo deste fungo nas áreas de plantio e assim determinando a sua inutilização por períodos mais prolongados. A presença deste fungo em áreas de plantio faz com que o uso das mesmas fique restrito a algumas espécies não hospedeiras.

A partir destas informações, fica claro que a atuação de *S. sclerotiorum* nos tecidos das sementes de feijão, em diferentes níveis de potencial de inóculo, apresenta uma redução do percentual de germinação de forma proporcional e linear, havendo um ajuste dos mais expressivos entre estas variáveis pela análise de regressão. Este padrão de atuação foi semelhante entre os dois isolados, bem como a reação das duas cultivares utilizadas neste trabalho.

Tabela 2 Valores de germinação (%) de sementes de feijão das cultivares Pérola e Ouro Negro infectadas com isolados de *S. sclerotiorum* em diferentes tempos de exposição das sementes ao inóculo do fungo. UFLA, Lavras, MG, 2011.

Potencial de inóculo	Germinação (%)*/Cultivares					
	Pérola			Ouro Negro		
	S1	S2	SF	S1	S2	SF
<b>P1</b>	71,5 Aa	64,0 Aa	97,5 Ab	59,5 Aa	75,5 Ab	98,0 Ac
<b>P2</b>	39,0 Ba	40,5 Ba	84,0 Bb	46,0 Ba	38,5 Ba	97,5 Ab
<b>P3</b>	22,5 Ca	35,5 Bb	65,5 Cc	9,50 Ca	21,0 Ca	90,5 Ab
<b>CV (%)</b>	<b>11,60</b>					

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

S1= isolado CMLAPS 02; S2= isolado CMLAPS 401; SF= sem fungo; tempos de exposição de sementes ao fungo: P1= potencial 36 horas; P2= potencial 72 horas; P3= potencial 96 horas.

Na mesma linha de pesquisa utilizando a soja como hospedeiro, foi verificado que *S. sclerotiorum* em sementes desta espécie foi severamente prejudicial à germinação e ao desenvolvimento após esta fase, conforme revelado pela avaliação de algumas variáveis (MACHADO et al., 2001). Estudos de Botelho (2011), também envolvendo sementes de soja, revelaram que o poder germinativo das sementes diminui com o aumento do tempo de exposição das sementes ao inóculo de *S. sclerotiorum*.

É importante registrar que, pela técnica de inoculação empregada neste estudo, as sementes são colocadas em contato com a colônia do fungo em desenvolvimento por tempos variáveis. Paralelamente, sementes de feijão são mantidas em substrato contendo apenas o restritor hídrico pelos mesmos períodos de tempo estabelecidos para o contato das sementes com o fungo. Neste caso, observa-se que a exposição mais prolongada das sementes ao substrato contendo manitol é também um fator de redução do poder germinativo, devendo esta influência ser considerada na análise estatística dos dados.

A incidência de *S. sclerotiorum* em sementes de ambas as cultivares de feijão, determinada pelo teste de Néon (método semisseletivo para este fungo) foi, em média, semelhante entre as duas cultivares (ANEXO B), havendo um aumento gradual dos valores médios desta variável com o aumento do potencial de inóculo. É interessante notar que os valores de incidência de *S. sclerotiorum* são variáveis em função dos potenciais de inóculo iniciais nas sementes (Tabela 3). Embora as sementes sejam consideradas infectadas pelo método de inoculação utilizado, a ocorrência do fungo em algumas sementes em todos os potenciais de inóculo não exibiu a presença do fungo em parte das sementes, o que comprova informações de literatura, segundo as quais a diversidade da qualidade das sementes em um mesmo lote é variável, atingindo, às vezes, limites não aceitáveis, do ponto de vista de certificação. As sementes de feijão utilizadas neste trabalho não apresentavam a presença de *S. sclerotiorum* antes

da inoculação destas com o fungo em diferentes tempos de exposição. Pela comparação entre os isolados do patógeno quanto à sanidade, houve diferença significativa entre eles no potencial de inóculo mais baixo, P1. Neste caso, a incidência do isolado S1 foi cerca de 14% inferior à do isolado S2. Nos potenciais mais elevados, o fungo, independente dos isolados, revela-se mais estabelecido nos tecidos das sementes infectadas, sendo detectado com segurança pelo método de Neon. Pelos resultados da análise de sementes não inoculadas, não houve infecção natural por *S. sclerotiorum* de nenhuma semente utilizada neste trabalho. Isso demonstra a eficácia do método de infecção empregado neste estudo.

Este tipo de informação ressalta o risco de uso de sementes de feijão em circunstâncias favoráveis para o desenvolvimento do mofo-branco, conforme tem sido salientado em trabalhos anteriores, para este e outros patossistemas de importância agrícola (NOVEMBRE, 2001; PARISI; PATRÍCIO; OLIVEIRA, 2006).

Tabela 3 Incidência (%) dos isolados de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão das cultivares Pérola e Ouro Negro, em função do tempo de exposição das sementes ao inóculo do patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2011.

	<b>Incidência (%) de <i>S. sclerotiorum</i> */ potencial de inóculo</b>		
	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>S1</b>	67,75 Ca	94,25 Bb	99,00 Bb
<b>S2</b>	81,25 Ba	98,75 Bb	99,75 Bb
SF	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
<b>CV (%)</b>	<b>9,18</b>		

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

S1= isolado CMLAPS 02; S2 = isolado CMLAPS 401; SF= sem fungo; tempos de exposição de sementes ao fungo: P1 = potencial 36 horas; P2 = potencial 72 horas; P3 = potencial 96 horas.

Em relação ao efeito de *S. sclerotiorum* no nível de vigor das sementes, representado neste trabalho pelo índice de velocidade de emergência (IVE), constatou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos analisados (Tabela 4 e 5, e ANEXO B). Pela análise do comportamento entre as cultivares Pérola e Ouro Negro, houve uma consistente superioridade da segunda, em ambos os isolados analisados. Para cada cultivar houve uma redução dos valores de IVE, quando em contato com os fungos. Esta redução, quando somado os isolados (S1 e S2) e comparados com o isolado sem fungo, foi superior a 58% para a cultivar Pérola e em torno de 32% para a cultivar Ouro Negro (Tabela 4).

Tabela 4 Valores do índice de velocidade de emergência (IVE) nas cultivares de feijão Pérola e Ouro Negro submetidas a isolados de *S. sclerotiorum*. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>Índice de velocidade de emergência*</b>			
<b>Cultivar</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>SF</b>
Pérola	1,08 Aa	1,50 Aa	3,08 Ab
Ouro Negro	2,71 Ba	2,35 Ba	3,72 Bb
<b>CV (%)</b>	<b>19,05</b>		

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

S1= isolado CMLAPS 02; S2 = isolado CMLAPS 401; SF= sem fungo

Pela comparação dos efeitos dos dois isolados de *S. sclerotiorum* nos valores de IVE, não houve diferenças estatísticas entre os potenciais de inóculo, exceto no potencial mais baixo, no qual o isolado S1 provocou um efeito mais acentuado no vigor das sementes infectadas neste nível. Vale ressaltar que a média de IVE inicial para as cultivares foi de 4,03. Neste caso, a ocorrência do referido fungo nas sementes em potenciais mais baixos pode ser uma forma de comparação do grau de resistência das sementes à referida doença, sob condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Na presença de potenciais de

inóculo mais elevados, como ocorre com os níveis P2 e P3, nenhum genótipo de feijoeiro evidencia o seu grau de resistência ao fungo em foco (Tabela 5). Em relação a cada isolado nos potenciais de inóculo, observa-se diferença significativa para ambos os isolados apenas no P1, com maior IVE, e posterior declínio conforme aumenta o tempo de contato com o patógeno.

Um aspecto muito importante que deve ser considerado em análises comparativas do vigor de sementes em trabalhos para avaliar comportamento de genótipos é a obtenção de lotes ou porções de sementes com o mesmo perfil de qualidade fisiológica e sanitária. No presente caso, observa-se que o IVE de sementes não inoculadas com *S. sclerotiorum* foram estatisticamente diferentes entre as duas cultivares, o que pode ter sido uma das causas da diferença observada em todos os potenciais de inóculo e a diferença entre os dois isolados no potencial de inóculo mais baixo.

Tabela 5 Valores médios do índice de velocidade de emergência (IVE) das cultivares de feijão Pérola e Ouro Negro inoculadas com isolados de *S. sclerotiorum* e submetidas a diferentes tempo de exposição das sementes ao inóculo do patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>Índice de velocidade de emergência*</b>			
	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>S1</b>	2,94 Aa	1,58 Ab	1,17 Ab
<b>S2</b>	3,79 Ba	1,15 Ab	0,84 Ab
<b>SF</b>	3,53 Ba	3,38 Ba	3,30 Ba
<b>CV (%)</b>	<b>19,05</b>		

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

S1 = isolado CMLAPS 02; S2 = isolado CMLAPS 401; SF = sem fungo; tempos de exposição de sementes ao fungo: P1 = potencial 36 horas; P2 = potencial 72 horas; P3 = potencial 96 horas.

Em trabalho recente realizado por Botelho (2011), nesta mesma linha de pesquisa com sementes de soja das cultivares Tucunará e Conquista inoculadas com dois isolados de *S. sclerotiorum*, observou-se que o índice de velocidade de emergência (IVE) das cultivares teve um decréscimo acentuado e gradual com o aumento do potencial de inóculo presente nas sementes. Este fato evidencia, por um lado, a importância do manejo desta doença, não somente por meio do uso de sementes saudáveis, como também por um cuidadoso programa de rotação de culturas, em que espécies não hospedeiras de *S. sclerotiorum* devem ser incluídas por longos períodos de tempo.

Os efeitos de *S. sclerotiorum* nos estandes de plantas em substrato de solo, em ensaio conduzido sob condições favoráveis para o desenvolvimento do mofo-branco, estão indicados nas Tabelas 5, 6, 7 e 8, e no Anexo B. Observa-se que houve diferenças significativas entre as duas cultivares e entre os potenciais de inóculo utilizados. Quando se comparam as cultivares com cada isolado no estande inicial, observa-se que a cultivar Pérola foi mais afetada com a presença dos isolados (Tabela 5). O mesmo ocorreu para com os potenciais de inóculo, havendo diferenças estatísticas entre os valores (Tabela 6), sabendo que a média de estandes iniciais das cultivares foi de 87,25%.

A redução do estande inicial para a cultivar Pérola no maior potencial de inóculo foi da ordem de 65,0% e da ordem de 27,0% para a cultivar Ouro Negro, quando comparado sem contato com o fungo. Quando os isolados são submetidos a cada potencial de inóculo, observa-se que ocorre um decréscimo linear para ambos isolados, diferindo do tratamento sem fungo nos potenciais P2 e P3 (Tabela 6). Em relação a cada isolado nos potenciais de inóculo, ocorre diferença significativa no P1 para o isolado S1, e no isolado S2 para o P1, P2 e P3. Conforme aumenta o tempo de exposição das sementes ao fungo, há uma redução no estande inicial

Tabela 5 Valores em percentual do estande inicial das cultivares de feijão na presença de isolados de *S. sclerotiorum*. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>Estande inicial*</b>			
<b>Cultivar</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>SF</b>
Pérola	31,00 Aa	36,50 Aa	72,16 Ab
Ouro Negro	70,50 Ba	62,33 Ba	91,83 Bb
<b>CV (%)</b>	<b>14,81</b>		

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

S1 = isolado CMLAPS 02; S2 = isolado CMLAPS 401; SF= sem fungo

Tabela 6 Valores em percentual do estande inicial das cultivares de feijão Pérola e Ouro Negro, e isolados de *S. sclerotiorum* em diferentes tempos de exposição ao patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>Cultivares</b>	<b>Estande inicial (%)</b>		
	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>Pérola</b>	70,50 Ab	39,00 Aa	30,17 Aa
<b>Ouro Negro</b>	91,00 Ba	70,00 Bb	63,67 Bb
<b>CV (%)</b>	<b>14,81</b>		
<b>Isolados</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>S1</b>	75,25 Ab	42,50 Aa	34,50 Aa
<b>S2</b>	82,75 Ac	38,50 Ab	27,00 Aa
<b>SF</b>	84,25 Aa	82,50 Ba	79,25 Ba
<b>CV (%)</b>	<b>14,81</b>		

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, para potencial de inóculo e minúscula, na linha, para cultivar e isolado, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

S1 = isolado CMLAPS 02; S2 = isolado CMLAPS 401; SF = sem fungo; tempos de exposição de sementes ao fungo: P1 = potencial 36 horas; P2 = potencial 72 horas; P3 = potencial 96 horas.

Em relação ao estande final, avaliado aos 28 dias de idade, houve diferença significativa entre as cultivares para cada isolado, tendo a ‘Ouro Negro’ apresentado um maior percentual do estande final. O mesmo foi observado no tratamento sem fungo (Tabela 7).

Tabela 7 Valores, em percentual, do estande final das cultivares de feijão Pérola e Ouro Negro submetidas a isolados de *S. sclerotiorum*. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>Cultivar</b>	<b>Estande final*</b>		
	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>SF</b>
Pérola	24,33 Aa	32,33 Aa	78,00 Ab
Ouro Negro	55,00 Ba	51,00 Ba	94,66 Bb
<b>CV (%)</b>	<b>17,41</b>		

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

S1 = isolado CMLAPS 02; S2 = isolado CMLAPS 401; SF = sem fungo

O percentual de estande final sem contato com a colônia do fungo foi de 90% e, conforme aumenta o tempo de exposição, há um decréscimo no valor desta variável, efeito semelhante observado no estande inicial. Está redução na população de plantas emergidas de ambas as cultivares foi de cerca de 73% no isolado S1 e de 82% para o isolado S2, ambos diferindo do tratamento sem fungo (Tabela 8).

Tabela 8 Valores médios em percentual do estande final das cultivares de feijão Pérola e Ouro Negro inoculadas com isolados de *S. sclerotiorum* e submetidas a diferentes potenciais de inóculo do patógeno. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>Estande final (%)</b>			
<b>Isolado</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>S1</b>	63,75 Ab	31,50 Aa	23,75 Aa
<b>S2</b>	84,50 Bb	24,50 Aa	16,00 Aa
<b>SF</b>	89,50 Ba	85,75 Ba	83,75 Ba
<b>CV (%)</b>	<b>17,41</b>		

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

S1 = isolado CMLAPS 02; S2 = isolado CMLAPS 401; SF = sem fungo; tempos de exposição de sementes ao fungo: P1 = potencial 36 horas; P2 = potencial 72 horas; P3 = potencial 96 horas.

Importante destacar o fato já mencionado sobre a qualidade fisiológica das sementes em trabalhos desta natureza, lembrando que a qualidade inicial de ambas as cultivares neste trabalho apresentavam alguma diferença, havendo uma superioridade deste quesito para a cultivar Ouro Negro. O efeito mais pronunciado do patógeno em sementes da cultivar Pérola pode ter sido também influenciado pela qualidade fisiológica inferior do lote de sementes desta cultivar, conforme já tem sido observado em outros trabalhos com outros patossistemas (ARAÚJO, 2008; BARROCAS, 2008; MACHADO et al., 2001; MORAES; MENTEN, 2006; SARTORI; REIS; CASA, 2004; SOUSA, 2006).

Em todos eles foram observadas reduções no IVE, no estande inicial e final de plantas e na germinação, a partir de sementes inoculadas com diferentes potenciais de inóculo.

Em relação à redução do peso de matéria seca da parte aérea, não houve variação de atuação dos dois isolados de *S. sclerotiorum* comparados neste estudo (Tabela 9 e ANEXO B). Pelos dados de pesos de plantas sem o contato

das sementes com o substrato contendo o restritor hídrico, nota-se que a cultivar Pérola apresenta características de menor tamanho do que a cultivar Ouro Negro, resultado semelhante ao observado por Andrade, Scapim e Braccini (2009) na cultivar de feijão carioca BRS MG Talismã em relação a ‘Ouro Negro’.

Tabela 9 Valores de peso de matéria seca de parte aérea de cultivares de feijão Pérola e Ouro Negro na presença de isolados de *S. sclerotiorum*. UFLA. Lavras, MG, 2011.

<b>Peso médio de matéria seca (g)*</b>			
<b>Cultivar</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>SF</b>
Pérola	10,33 Aa	9,63 Aa	15,90 Ab
Ouro Negro	9,39 Aa	10,70 Aa	24,32 Bb
<b>CV (%)</b>	<b>25,16</b>		

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

S1 = isolado CMLAPS 02; S2 = isolado CMLAPS 401; SF = sem fungo

Em relação ao sistema radicular de plantas, os pesos iniciais das cultivares Pérola e Ouro Negro sem contato com o fungo foram de 16,44 e 19,62 g, respectivamente. Os níveis de redução dos valores de peso, quando em contato com os isolados do fungo, foram da ordem de 69%, para a cultivar Pérola e de 78,5%, para a cultivar Ouro Negro, pois, conforme aumenta o potencial de inóculo, há uma redução no peso das raízes (Tabela 10 e ANEXO B). Neste quesito, não houve variação de atuação dos dois isolados de *S. sclerotiorum* comparados neste estudo, seja para as cultivares, como para os potenciais de inóculo. Pelos dados referentes aos tratamentos sem a presença do fungo, percebe-se que houve um efeito deste fator semelhante ao observado anteriormente, da ordem de 50% para as cultivares.

Tabela 10 Valores de peso de matéria seca da raiz de plantas de feijão cultivares Perola e Ouro Negro infectadas por isolados de *S. sclerotiorum* em diferentes potenciais de inóculo do fungo. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>Peso de matéria seca de raiz (g)*</b>						
	<b>Pérola</b>			<b>Ouro Negro</b>		
	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>SF</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>SF</b>
<b>P1</b>	8,39 Aa	7,61 Aa	11,21 Ab	6,99 Aa	8,99 Aa	19,17 Ac
<b>P2</b>	5,41 Ba	5,21 Ba	9,41 Bb	5,97 Aa	5,97 Ba	14,65 Bb
<b>P3</b>	4,76 Ba	4,52 Ba	8,00 Bb	4,02 Ba	4,28 Ba	9,96 Cb
<b>CV (%)</b>	<b>12,84</b>					

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

S1 = isolado CMLAPS 02; S2 = isolado CMLAPS 401; SF = sem fungo; tempo de exposição de sementes ao fungo: P1 = potencial 36 horas; P2 = potencial 72 horas; P3 = potencial 96 horas.

#### 4 CONCLUSÕES

Nas sementes de feijoeiro, a presença de *S. sclerotiorum* na forma micelial e em diferentes potenciais de inóculo provoca reduções acentuadas e progressivas dos níveis de germinação, vigor, estandes, peso e altura de plantas, sob condições favoráveis para o desenvolvimento da doença correspondente.

Os efeitos da associação do fungo com as sementes podem variar em função do genótipo do feijoeiro e dos isolados do patógeno. Para algumas das variáveis avaliadas, as diferenças foram mais evidentes nos potenciais de inóculo inferiores.

Nos potenciais de inóculo mais elevados, que correspondem a uma maior pressão de inóculo infectivo, ambas as cultivares e ambos os isolados de *S. sclerotiorum* apresentaram desempenhos semelhantes, com danos progressivos ao desenvolvimento das plantas oriundas de sementes infectadas pelo patógeno.

De maneira geral, fica evidenciado neste trabalho que o uso de sementes de feijoeiro infectadas por *S. sclerotiorum* constitui uma forma importante de disseminar o inóculo deste patógeno entre áreas de plantio, além de contribuir para a redução das produtividades dessa cultura em ambientes favoráveis para o desenvolvimento da doença que este patógeno causa.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, C. A. B.; SCAPIM, C. A.; BRACCINI, A. L. Produtividade, crescimento e partição de matéria seca em duas cultivares de feijão. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 683-688, 2009.

ARAÚJO, D. V. **Caracterização molecular, patogenicidade e transmissão pela semente de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em algodoeiro**. 2008. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BARROCAS, E. N. **Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas**. 2008. 110 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BOTELHO, L. S. **Relações de *Sclerotinia sclerotiorum* com sementes de soja: detecção e transmissibilidade de patógeno**. 2011. 156 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, 2009a. 200 p.

\_\_\_\_\_. **Regras de análise de sementes**. Brasília, 2009b. 399 p.

CARVALHO, J. C. B. de. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, set./out. 2003.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. Software.

FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, p. 9-13, 1967.

- LIMA, E. F. et al. Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides*, através da sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 105-115, jan. 1985.
- MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107 p.
- MACHADO, J. C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 95-101, mar./abr. 2001.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.
- MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, Jan./Feb. 1995.
- MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Transmissão de *Alternaria* spp. através de sementes de feijão e seu efeito sobre a qualidade fisiológica das sementes. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 4, p. 381-383, 2006.
- NAPOLEAO, R. et al. Neon-S, novo meio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 2, p. 180-182, 2006.
- NASSER, L. C. B.; ARANCIBIA, R. C.; NAPOLEÃO, R. Uso do meio Neon modificado para determinação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão produzidas em áreas irrigadas do cerrado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 309, 1999. Resumo.
- NOVEMBRE, A. D. L. C. Avaliação da qualidade de sementes. **Seed News**, Pelotas, v. 5, n. 3, maio/jun. 2001. Disponível em: <<http://www.seednews.inf.br>>. Acesso em: 10 maio 2011.
- OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. **DBO Agrotecnologia**, São Paulo, v. 2, n. 4, p. 8-13, 2005.
- PARISI, J. J. D.; PATRÍCIO, F. R. A.; OLIVEIRA, H. F. Método do rolo de papel toalha modificado para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em

sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 288-290, 2006.

PERES, A. P. **Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill): desenvolvimento de metodologias.** 1996. 51 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

SARTORI, A. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 456-458, jul./ago. 2004.

SOUSA, M. V. **Metodologias de inoculação e detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.).** 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

**ANEXO A** - Avaliação da sensibilidade *in vitro* de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* a fungicidas

Tabela 1 Resumo da análise de variância para o isolado CMLAPS 05, submetido a diferentes tratamentos e concentrações (ppm) de fungicidas. UFLA, Lavras, MG, 2011\*\*.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Tratamento fungicida (F)	4	32.5204	8.1301	0,0000*
Concentração (PPM)	4	23.9073	5.9768	0,0000*
F x PPM	16	17.8011	1.1125	0,0000*
Resíduo	75	6.7116	0.0894	
Média	1,4249			
CV (%)	20,99			

\*Significativo, a 5% de significância, pelo teste de F; <sup>ns</sup> Não significativo

\*\* Dados transformados (raiz quadrada de Y + 1)

Tabela 2 Resumo da análise de variância para o isolado CMLAPS 246, submetido a diferentes tratamentos e concentrações (ppm) de fungicidas. UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Tratamento fungicida (F)	4	46.0623	11.5155	0,0000*
Concentração (ppm)	4	18.8174	4.7043	0,0000*
F x ppm	16	21.2492	1.3280	0,0000*
Resíduo	75	7.1084	0.0947	
Média	1,4992			
CV (%)	20,54			

\*Significativo, a 5% de significância, pelo teste de F; <sup>ns</sup> Não significativo

\*\* Dados transformados (raiz quadrada de Y + 1)

**ANEXO B** - Relação entre potencial de inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum* e desempenho de sementes de feijão infectadas

Tabela 1 Resumo da análise de variância para germinação das cultivares de feijoeiro Pérola e Ouro Negro submetidas a diferentes tempos de exposição (0, 36, 72 e 96 horas) aos isolados de *S. sclerotiorum* CMLAPS 02 e 401. UFLA, Lavras, MG, 2011.

FV	GL	SQ	QM	F
Cultivares (C)	1	56,8888	56,8888	0,2726 <sup>NS</sup>
Isolados (I)	2	33004,0000	16502,0000	0,0000*
Potencial de inóculo (PI)	2	16396,3333	8198,1666	0,0000*
C x I	2	1189,7777	594,8888	0,0000*
C x PI	2	175,444	87,7222	0,1602 <sup>NS</sup>
I x PI	4	2395,6666	598,9166	0,0000*
C x I x PI	4	1609,8888	402,4722	0,0000*
Resíduo	54	2500,0000	46,2962	
Média	58,6666			
CV (%)	11,60			

\*Significativo, a 5% de significância, pelo teste de F; <sup>NS</sup> Não significativo

Tabela 2 Resumo da análise de variância para a incidência dos isolados de *S. sclerotiorum* (CMLAPS 02 e 401) em diferentes tempos de exposição das sementes (0, 36, 72 e 96 horas) das cultivares de feijoeiro Pérola e Ouro Negro. UFLA, Lavras, MG, 2011.

FV	GL	SQ	QM	F
Cultivares (C)	1	53,3888	53,3888	0,1909 <sup>NS</sup>
Isolados (I)	2	130429,0000	65214,5000	0,0000*
Potencial de inóculo (PI)	2	3950,3333	1975,1666	0,0000*
C x I	2	117,4444	58,7222	0,1550 <sup>NS</sup>
C X PI	2	15,4444	7,7222	0,7768 <sup>NS</sup>
I X PI	4	2318,6666	579,6666	0,0000*
C x I X PI	4	44,2222	11,0555	0,8336 <sup>NS</sup>
Resíduo	54	1643,0000	30,4259	
Média	60,0833			
CV (%)	9,18			

\*Significativo, a 5% de significância, pelo teste de F; <sup>NS</sup> Não significativo

Tabela 3 Resumo da análise de variância para índice de velocidade de emergência do feijoeiro das cultivares Pérola e Ouro Negro, submetidas à inoculação com os isolados CMLAPS 02 e CMLAPS 401 de *S. sclerotiorum* em diferentes tempos de exposição das sementes ao inóculo (0, 36, 72 e 96 horas). UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Cultivares (C)	1	19,3582	19,3582	0,0000*
Isolados (I)	2	35,4613	17,7306	0,0000*
Potencial de inóculo (PI)	2	37,7210	18,8605	0,0000*
C x I	2	3,2314	1,6157	0,0012*
C X PI	2	0,1274	0,0637	0,7404 <sup>NS</sup>
I X PI	4	18,2809	4,5702	0,0000*
C x I X PI	4	0,7450	0,1862	0,4803 <sup>NS</sup>
Resíduo	54	11,3894	0,2109	
Média	2,4104			
CV (%)	19,05			

\*Significativo, a 5% de significância, pelo teste de F; <sup>NS</sup> Não significativo

Tabela 4 Resumo da análise de variância para o estande inicial de feijão das cultivares Pérola e Ouro Negro submetidas à inoculação com os isolados CMLAPS 02 e CMLAPS 401 de *S. sclerotiorum* em diferentes tempos de exposição das sementes ao inóculo (0, 36, 72 e 96 horas). UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Cultivares (C)	1	14450,0000	14450,0000	0,0000*
Isolados (I)	2	16320,1111	8160,0555	0,0000*
Potencial de inóculo (PI)	2	15130,1111	7565,0555	0,0000*
C x I	2	1236,3333	618,1666	0,0012*
C X PI	2	571,0000	285,5000	0,0362*
I X PI	4	6294,2222	1573,5555	0,0000*
C x I X PI	4	546,6666	136,6666	0,1657 <sup>NS</sup>
Resíduo	54	4366,0000	80,8518	
Média	60,7222			
CV (%)	14,81			

\*Significativo, a 5% de significância, pelo teste de F; <sup>NS</sup> Não significativo

Tabela 5 Resumo da análise de variância para estande final de feijão das cultivares Pérola e Ouro Negro, submetidas à inoculação com os isolados CMLAPS 02 e CMLAPS 401 de *S. sclerotiorum* em diferentes tempos de exposição das sementes ao inóculo (0, 36, 72 e 96 horas). UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Cultivares (C)	1	8712,0000	8712,0000	0,0000*
Isolados (I)	2	33415,1111	16707,5555	0,0000*
Potencial de inóculo (PI)	2	20090,7777	10045,3888	0,0000*
C x I	2	688,0000	344,0000	0,0331*
C X PI	2	136,3333	68,1666	0,4915 <sup>NS</sup>
I X PI	4	9551,2222	2387,8055	0,0000*
C x I X PI	4	411,6666	102,9166	0,3723 <sup>NS</sup>
Resíduo	54	5114,0000	94,7037	
Média	55,8888			
CV (%)	17,41			

\*Significativo, a 5% de significância, pelo teste de F; <sup>NS</sup> Não significativo

Tabela 6 Resumo da análise de variância para peso de matéria seca de parte aérea de plantas feijão das cultivares Pérola e Ouro Negro, submetidas à inoculação com os isolados CMLAPS 02 e CMLAPS 401 de *S. sclerotiorum* em diferentes tempos de exposição das sementes ao inóculo (0, 36, 72 e 96 horas). UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Cultivares (C)	1	145,9998	145,9998	0,0001*
Isolados (I)	2	1634,0666	817,0333	0,0000*
Potencial de inóculo (PI)	2	668,5003	334,2501	0,0000*
C x I	2	291,5610	145,7805	0,0000*
C X PI	2	49,6826	24,8413	0,1217 <sup>NS</sup>
I X PI	4	57,5431	14,3857	0,2937 <sup>NS</sup>
C x I X PI	4	71,0039	17,7509	0,1968 <sup>NS</sup>
Resíduo	54	612,3740	11,3402	
Média	13,3849			
CV (%)	25,16			

\*Significativo, a 5% de significância, pelo teste de F; <sup>NS</sup> Não significativo

Tabela 7 Resumo da análise de variância para peso de matéria seca de raiz de plantas de feijão das cultivares Pérola e Ouro Negro, submetidas a inoculação com os isolados CMLAPS 02 e CMLAPS 401 de *S. sclerotiorum* em diferentes tempos de exposição das sementes ao inóculo (0, 36, 72 e 96 horas). UFLA, Lavras, MG, 2011.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Cultivares (C)	1	52,5432	52,5432	0,0000*
Isolados (I)	2	588,9539	294,4769	0,0000*
Potencial de inóculo (PI)	2	240,1333	120,0666	0,0000*
C x I	2	104,8291	52,4145	0,0000*
C X PI	2	17,7868	8,8934	0,0007*
I X PI	4	20,6951	5,1737	0,0020*
C x I X PI	4	25,4383	6,3595	0,0000*
Resíduo	54	57,3542	1,0621	
Média	8,0291			
CV (%)	12,84			

\*Significativo, a 5% de significância, pelo teste de F; <sup>ns</sup> Não significativo